

INFORMATIONS TECHNIQUES

Deuxième cours sur le diagnostic de la peste bovine

(Laboratoire de Farcha 10-15 juin 1963)

En mai 1961, la C. C. T. A., qui comprend, entre autres, la Fondation pour l'Assistance Mutuelle en Afrique (F. A. M. A.) et le Bureau interafricain pour la santé animale (I. B. A. H.) suscita à Kano (Nigeria) une importante conférence qui étudia les moyens de réaliser une campagne d'éradication de la peste bovine sur le territoire des Etats du Cameroun, du Niger, de la Nigeria et du Tchad.

Ce projet, classique dans sa conception, renforce les actions des Services de l'Elevage des Etats intéressés grâce aux importants moyens que l'A. I. D. et la C. E. E. mettent à leur disposition par le canal de la C. C. T. A.

En principe sont menées de front :

- la vaccination antipestique systématique et contrôlée du cheptel bovin,
- l'harmonisation des législations sanitaires,
- la coercition immédiate des contrevenants grâce à une procédure d'urgence et expéditive,
- la progression des recherches scientifiques sur le diagnostic de la peste bovine et sa prophylaxie.

Un premier cours sur le diagnostic de la peste bovine, s'est déroulé en 1961 au laboratoire de Muguga (Nairobi-Kenya), le second, en 1963 à Fort-Lamy. Les conférences et travaux pratiques ont eu lieu au laboratoire de recherches vétérinaires de Farcha dont la gestion a été confiée à l'Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux. Ce cours se plaçait sous l'égide de la F. A. M. A. et était organisé par l'Institut. Il s'est déroulé, sous la direction de M. THOME, directeur régional de l'I. E. M. V. T. Conférences et manipulations furent assurées en anglais et en français par MM. PROVOST et BORREDON.

Si nous publions aujourd'hui le texte des exposés qui ont été faits, c'est qu'il nous a semblé que les vétérinaires qui travaillent sur le terrain à lutter contre la peste bovine y trouveraient des méthodes utilisables dans les conditions pratiques de la brousse. Mais nous tenons cependant à préciser que les méthodes expérimentales qui sont décrites doivent être considérées comme des moyens complémentaires de diagnostic et ne prétendent pas se substituer aux méthodes classiques de la clinique et de l'épizootologie.

Les différents aspects du diagnostic clinique et expérimental de la peste bovine

par A. PROVOST et C. BORREDON

AVANT-PROPOS

Nous n'avons pas la prétention, dans l'exposé qui va suivre, de faire preuve d'originalité. C'est une compilation en langue française de travaux épars dans la littérature, assortie de réflexions venant de notre expérience personnelle. Les techniques décrites ont en effet été essayées et « rodées » à Farcha depuis 1955 ; nous avons fait un tri, parmi toutes celles qui ont été proposées, pour ne retenir que celles qui nous paraissent les plus simples d'exécution et les mieux adaptées aux conditions tropicales. Nous avons eu le souci constant, dans la description des méthodes de diagnostic, de nous placer à la portée du vétérinaire de brousse et du laboratoire régional, souvent dépourvus de moyens techniques du dernier cri mais forts de leur bonne volonté. C'est pour eux, et pour l'œuvre d'éradication de la peste bovine du continent africain à laquelle ils se sont voués, que ces lignes ont été écrites. Puissent-elles remplir leur but, c'est notre souhait.

Nous remercions la Revue *Veterinary Medicine* ainsi que l'*American Veterinary Medical Association* d'avoir bien voulu nous autoriser à reproduire des illustrations déjà publiées.

Le Professeur F. K. RAMSEY, Iowa State University, Ames, et le Docteur MACKOWIACK, de l'I. F. F. A., ont eu l'amabilité de nous communiquer leurs clichés originaux.

Enfin la Revue *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* a bien voulu nous prêter ses typons.

A tous nous adressons nos sincères remerciements.

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1963, 16, n° 4.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos

Première partie

DIFFICULTÉS ACTUELLES D'UN DIAGNOSTIC DE CERTITUDE DE LA PESTE BOVINE.

I. Peste bovine « historique » et peste actuelle	449
II. Le nouveau visage de la peste	449
chez les bovins. 1. Aspect épizootiologique	449
2. Aspects cliniques	450
3. Les facteurs en cause	450
le bétail	451
le virus	451
chez les ovins et les caprins	452
chez le chameau	452
chez le gibier	453
III. Les maladies « pestiformes »	453
IV. La difficulté du diagnostic	454

Seconde partie

DIAGNOSTIC CLINIQUE DIFFÉRENTIEL DE LA PESTE BOVINE ET DES MALADIES ATTEIGNANT LES MUQUEUSES.

Maladie cliniquement semblable à la peste bovine. — L'entérite à virus	455
Affections atteignant la muqueuse buccale	461
1. La fièvre aphteuse	461
2. La stomatite vésiculeuse	463
3. La blue tongue	463
4. La stomatite papuleuse	465
5. La diphthérie des veaux ou nécrobacillose	465
6. Stomatites diverses	465
Affections atteignant la muqueuse conjonctivale	466
Affections atteignant les muqueuses respiratoires	466
1. La rhinotrachéite bovine infectieuse	466
2. Le coryza gangréneux	472
3. La fièvre des transports	474

Affections touchant la muqueuse de la caillette	474
Affections touchant la muqueuse intestinale	475

Troisième partie

DIAGNOSTIC EXPÉRIMENTAL DE LA PESTE BOVINE

I. Diagnostic histologique	476
II. Diagnostic virologique	478
A. Reproduction de la maladie	478
B. Isolement et identification du virus en cultures cellulaires	480
III. Diagnostic sérologique	481
Rappels préliminaires	481
A. Recherche de l'antigène pestique	481
précipitation-diffusion en gélose	481
déviation du complément	482
B. Recherche des anticorps antipestiques	484
séro-neutralisation	484

Quatrième partie

LA CONDUITE DU DIAGNOSTIC — CHOIX D'UNE MÉTHODE

.....	486
-------	-----

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique n° 1. Modèle de fiche de renseignements	488
— — n° 2. Prélèvements à faire en vue d'un diagnostic histologique de peste bovine.	489
— — n° 3. Méthodologie des prélèvements pour diagnostic de la peste bovine par culture cellulaire	490
Fiche technique n° 4. La séro-neutralisation	491
— pour l'identification du virus	491
— pour la recherche des anticorps	493
— — n° 5. La déviation du complément	495
A — Mise en évidence de l'antigène	495
• technique de Nakamura	495
• — de Boulanger	499
• — de Cowan	500
• — de Stone et Moulton	502
B — Mise en évidence des anticorps	505
— — n° 6. La réaction de précipitation en gélose	506
• préparation des antigènes de référence	506
• préparation du sérum précipitant	509
• préparation de la gélose	515
• préparation des antigènes suspects	516
• exécution du test	517
— — n° 7. Méthodologie des prélèvements de sérum pour diagnostic rétrospectif de peste bovine	523
— — n° 8. Adresses utiles	524
Bibliographie	525

2^{de} PARTIE**DIFFICULTÉS ACTUELLES D'UN DIAGNOSTIC DE CERTITUDE
DE LA PESTE BOVINE****I. — PESTE « HISTORIQUE » ET PESTE « ACTUELLE » ***

Dix lustres avant que ces lignes ne soient écrites, ces titres eussent paru insolites. Pour NOCARD et LECLAINCHE, pour ROBERT KOCH, pour THEILER, en ne citant que ces auteurs et sans vouloir remonter le cours du temps, le diagnostic clinique ou nécropsique de la peste bovine s'établissait d'emblée et ne prêtait pas à discussion. Il s'imposait par la reconnaissance de l'extension du contag, la clinique et les lésions caractéristiques sur les bovins malades, et par une mortalité extrêmement importante.

Peu de données devaient être ajoutées à ces éléments du diagnostic par CURASSON, par DAUBNEY et par JACOTOT, et l'on peut dire que jusqu'à ces dernières années, rien n'était modifié quant à la relative facilité du diagnostic du typhus bovin.

Mais, comme d'autres maladies animales, la peste bovine a changé de visage. La grande peste africaine des années 1890-1900 est de nos jours une peste « historique ». Si, pendant cette période, plus de 90 p. 100 du bétail d'Afrique noire fut tué par la maladie classique telle que l'ont décrite les auteurs, on ne peut citer durant ces dernières années que deux épizooties, heureusement limitées dans leur extension par des circonstances géographiques, qui ont présenté sa gravité et ses caractères : ce sont celle de l'Adamaoua au Cameroun en 1960 et celle de la province d'Equateur au Congo en 1961. Là, la morbidité fut de près de 100 p. 100 et la mortalité de 85 à 90 p. 100 avant l'intervention sanitaire.

En dehors de ces deux exemples, la peste historique n'est plus rencontrée de nos jours en Afrique noire. Il s'y est substitué une peste « atypique » que nous qualifierons plus volontiers « d'actuelle ». Ce n'est pas brusquement toutefois, que ses manifestations ont supplanté celles de la peste classique. Dès 1935 existait dans le centre africain une peste à symptomatologie particulière qu'a décrite RECEVEUR (1937). Elle est maintenant la plus commune. Nous la commenterons brièvement.

II. — LE NOUVEAU VISAGE DE LA PESTE BOVINE**CHEZ LES BOVINS****I. Aspect épizootiologique.**

Les jeunes de 6 à 14 mois sont le plus souvent atteints et il est fréquent pour ne pas dire constant, de ne voir que des animaux de ce groupe d'âge malades dans un troupeau ; les veaux plus jeunes, les animaux plus vieux, sont épargnés.

Des bovins plus âgés (2 à 3 ans, voire des adultes) peuvent également contracter la peste ; mais ces animaux se rencontrent dans des régions très particulières, soit d'accès difficile incitant les vétérinaires à une action réservée (montagnes de l'Ennedi et îles du Lac Tchad), soit infectées de glossines ; les vaccinations sont alors mises en œuvre avec prudence par crainte de réactions vaccinales par

* : Les opinions émises et les indications proposées sont spécialement valables pour les zones occidentales et centrales du continent africain. (Note des auteurs)

trop fâcheuses (région de la Bénoué au Cameroun). Sur ces bovins d'âge plus avancé, l'expression clinique de la peste est plus franche que sur les jeunes.

Limitée à un groupe d'âge, la peste bovine l'est également dans son extension. Les épizooties dévastatrices sont du domaine du passé. Les foyers sont sporadiques, évoluant dans un troupeau, gagnant les troupeaux immédiatement voisins où en général seuls les jeunes sont touchés. La situation sanitaire est depuis deux lustres quelque peu comparable à celle de la fièvre aphteuse en Europe lors des périodes d'interépizooties.

Ce tableau très général ne voudrait cependant pas être exclusif. Il arrive que des symptômes pestiformes soient relevés sur des bovins adultes. Il est vraisemblable qu'il s'agit souvent de peste, surtout si ces animaux vivent dans un foyer, mais nous verrons en abordant le diagnostic clinique combien il convient en fait d'être prudent en posant de nos jours un diagnostic de peste bovine sur le bétail adulte vivant en régions vaccinées.

Différent est par contre le problème que posent les enclaves non vaccinées jouxtant les territoires infectés : Adamaoua au Cameroun, République Centrafricaine. Une incursion dévastatrice de peste y est toujours à redouter, témoin celle de 1960 en Adamaoua. En ces circonstances, le caractère envahissant du typhus bovin se retrouve en entier.

2. Aspects cliniques.

Il est malaisé de systématiser les différentes formes, intriquées les unes dans les autres. On peut néanmoins citer :

— *les pestes à incubation longue*, de 25 à 40 jours, d'observation courante au Tchad. La notion de contamination est alors particulièrement difficile à établir.

— *les formes apyrétiques* : les lésions buccales apparaissent, la diarrhée s'installe puis survient la mort dans un laps de temps assez bref. La température ne s'élève pas au-dessus de 38°5-38°8 C. Cette forme est extrêmement fréquente dans le centre africain.

— *les formes « eutrophiques »* : la prostration qui est classique et a permis de donner le nom de typhus bovin à la peste, ne se manifeste guère chez les jeunes. Jusqu'à la mort l'animal conserve son habitus normal. Il mange jusqu'à la dernière extrémité et il n'est pas rare de trouver des cadavres qui gardent serrés entre leurs mâchoires les derniers brins de paille qu'a broutés l'animal avant sa mort.

— *les formes non ulcératives*. Les lésions buccales n'apparaissent pas. La diarrhée s'établit, l'animal se cachectise et meurt dans le marasme. Ce sont des formes relativement fréquentes au laboratoire. En d'autres circonstances, la santé revient après cessation de la diarrhée.

— *les formes amyotrophiques*, caractérisées par une diarrhée profuse et une fonte musculaire spectaculaire du train postérieur, croupe et cuisse.

— *les formes nerveuses*, à vrai dire extrêmement rares, avec mouvement de tournis, attitudes anormales, mugissements et parfois fureur ; elles semblent être dues à une piroplassose, à une heart-water (ou à une theileriose, là où celle-ci existe) concomitantes;

— *les formes pulmonaires* ont été signalées récemment en Egypte : hyperthermie, légère diarrhée, larmolement et écoulement nasal, toux rauque. A l'autopsie, on ne constate qu'une pneumonie lobaire apicale avec une légère gastro-entérite et émaciation musculaire. Ces lésions en imposent pour le diagnostic de fièvre des transports mais l'isolement du virus prouve qu'il s'agit du virus bovipestique.

— *les formes lentes* (plutôt que chroniques), avec poussées thermiques fugaces qu'accompagnent des épisodes diarrhéiques et des accidents congestifs. Après quelques récurrences espacées de périodes de 15 à 20 jours, la constipation succède à la diarrhée. La guérison intervient souvent mais amène toujours un amaigrissement de l'animal auquel il sera très difficile de faire reprendre de l'état.

3. Les facteurs en cause.

Comme toutes les maladies virales, la peste bovine se joue à deux partenaires : le bétail d'un côté, le virus d'un autre. Tous deux ont leurs implications dans cette peste actuelle.

a) Le facteur bétail.

1° Etat immunitaire

La grande majorité (90 p. 100 au moins) du bétail des régions où la peste est encore généralement considérée comme enzootique, est immune de peste par l'un ou l'autre des 3 processus suivants :

— Immunité naturelle qui a suivi une attaque plus ou moins violente de la maladie naturelle dans le passé.

— Immunité vaccinale, conférée par l'un des virus-vaccins, généralement aussi solide que la première quoique d'une durée moindre en ce qui concerne le virus-vaccin lapinisé.

— Immunité colostrale, transmise par la mère immune (naturellement ou par vaccination) à son veau. Il a été démontré que les anticorps présents dans le colostrum (et non dans le lait) étaient absorbés par l'intestin du veau nouveau-né à jeun et qu'après cette première tétée le taux d'anticorps du veau, nul à la naissance, égalait celui de sa mère.

Ces anticorps persistent chez le veau jusqu'à l'âge de 10 mois mais ne s'opposent victorieusement à l'infection pestique (naturelle ou vaccinale) que jusqu'à l'âge moyen de 6 mois *.

On a ainsi l'explication du schéma épizootologique évoqué plus haut : population adulte (au-dessus de 18 mois) immune, veaux sous leurs mères immuns, jeunes sevrés réceptifs parce qu'ayant perdu leur immunité colostrale et non encore vaccinés car les campagnes de vaccination sont annuelles.

Si cet état immunitaire particulier du troupeau africain explique l'épizootologie nouvelle de la peste sur ce continent, il n'en est pas moins important de souligner que la réceptivité au virus (sauvage, capripastique ou lapinisé) du veau qui a perdu ses anticorps colostraux est pleine et entière : témoins en sont les réactions vaccinales parfois violentes sur les jeunes de 12 à 14 mois qui suivent la vaccination au virus capripastique.

2° état nutritionnel et hormonal

La réceptivité immunologique est une chose, la « réactivité » de l'organisme bovin à l'agression virale en est une autre. On sait qu'une part importante de la symptomatologie d'une maladie infectieuse est jouée par la réaction d'alarme déclenchée par le complexe neuro-surrénalien. Cette réaction sous la dépendance d'une décharge de glycocorticoïdes, se caractérise notamment par une exacerbation de la fièvre, l'apparition de la congestion dans divers parenchymes.

C'est par ailleurs une notion de pathologie générale classique que les signes cliniques d'une infection virale sont mieux extériorisés chez les sujets pléthoriques que chez les sujets cachectiques. Or les veaux sevrés sont sous-alimentés parce que leur sevrage intervient fréquemment pendant la saison sèche, et de surcroît parasités par toute une gamme de nématodes et des cestodes. Leur organisme est en état d'hypofonctionnement surrénalien, ce qui entraîne une réduction des réactions inflammatoires virales non spécifiques (congestion, certaines ulcérations) et de l'hyperthermie.

b) Le facteur virus.

L'unicité immunologique du virus bovipastique ne saurait être mise en doute ; le virus est antigéniquement le même qu'il soit isolé au Viet-Nam, au Kenya ou au Tchad. Mais il est sûr qu'il existe toute une gamme de pouvoir pathogène dans les souches sauvages. Cette variation du comportement du virus a été longtemps suspectée mais ce n'est qu'assez récemment qu'elle a été mise en évidence.

Faisant suite aux observations de LOWE (1947) qui avait décrit une souche naturellement atténuée chez le bétail, ROBSON (1959) a isolé au Tanganyika une souche pestique chez l'élan. Inoculée à des zébus pleinement sensibles, originaires de zones non contaminées, non vaccinés et vierges de tout anticorps, elle n'a donné lieu qu'à une montée thermique sans lésions buccales, ni diarrhée ; la guérison est intervenue rapidement. Passée sur du bétail de type européen, elle déterminait une

* Des observations faites au Tchad montrent que le veau recouvre d'abord sa sensibilité au virus pestique sauvage avant de recouvrer celle au virus capripastique.

siomatite, un peu de diarrhée, aucune mortalité. Les passages en série n'augmentaient pas le pouvoir pathogène du virus.

Sept autres souches se comportant de la même manière et ayant la caractéristique essentielle de ne pas déterminer de diarrhée et d'être non léthales, viennent d'être étudiées par PLOWRIGHT (1963) en Afrique orientale.

Ces faits extrêmement probants démontrent la plasticité du virus. On peut se demander par quel mécanisme un virus pleinement virulent à l'origine se transforme ainsi en virus peu pathogène. L'opinion de RECEVEUR (1951) qui supposait une transformation du virus évoluant sur un bétail semi-immun est très plausible. C'est ce même phénomène qui a été invoqué pour la transformation du virus pestique en celui de la peste des petits ruminants par adaptation à des races caprines peu sensibles (MORNET, ORUE, et GILBERT, 1956). Nous avons nous-mêmes observé au laboratoire une transformation du virus capripestique qui, par passages sur des chèvres résistantes, devenait extrêmement pathogène pour la chèvre et inactif chez les bovins.

Ainsi comprend-on l'apparition d'une symptomatologie bâtarde de la peste bovine chez les jeunes : des virus à pouvoir pathogène amoindri infectent des veaux pouvant encore posséder un état immunitaire résiduel et déséquilibrés surrénaux. L'expression clinique du typhus s'en trouve perturbée chez le malade et l'extension de la maladie freinée dans le troupeau.

La question de plasticité du virus pose un problème difficile pour le diagnostic car NAKAMURA a montré que le développement de l'antigène déviant le complément dans les ganglions lymphatiques des bovins inoculés reflétait le pouvoir pathogène de la souche. Or nous verrons plus loin que l'antigène déviant le complément et le précipitogène sont étroitement apparentés sinon semblables, si bien qu'une incertitude règne actuellement sur la possibilité de diagnostic de ces souches pestiques hypo-virulentes pour le bétail par la méthode de précipitation en gélose.

Un intérêt certain s'attache à la reconnaissance de ces pestes atypiques, que cette « atypie » ait pour origine un état immunitaire particulier du bétail ou une hypo-virulence du virus. En effet troublantes par leur symptomatologie, elles peuvent faire aiguiller le diagnostic de peste sur une autre voie, avec le corollaire de la non-intervention sanitaire alors que subsiste le danger potentiel d'une *résurgence explosive de la virulence du contagion*.

La sagesse veut donc que même pour un diagnostic clinique incertain, on prenne toutes mesures utiles en attendant sa confirmation qu'apportera le diagnostic expérimental.

CHEZ LES OVINS ET LES CAPRINS

La réceptivité expérimentale des petits ruminants domestiques africains est un fait établi, mais jusqu'à ces années dernières, on ne connaissait que deux épizooties authentiques en Afrique de peste bovine naturelle sur de petits ruminants (en Egypte en 1893, en Afrique du Sud vers 1894).

Cependant, en 1957 un foyer de peste bovine est apparu sur des moutons à Vom en Nigeria. Le transport du contagion a été assuré par des bovins qui ont infecté les moutons de race locale. La symptomatologie chez les moutons se manifestait spécialement par une diarrhée et un jetage muco-purulent. Des guérisons ont eu lieu.

En 1958, la peste fut reconnue sur les chevreaux en Ouganda. La maladie était sub-clinique. Une enquête sérologique montra, par l'importance des sujets présentant des anticorps, que la maladie était enzootique.

Est-ce que, comme le suggère DAUBNEY (1949), la peste est en extension sur les petits ruminants ? Les seules observations sont incapables d'y répondre mais elles ont le mérite d'attirer l'attention pour les années à venir.

CHEZ LE CHAMEAU

La peste bovine naturelle chez le chameau n'a jamais été constatée avec certitude en Afrique. Une étude récente de SCOTT et Mac DONALD (1962) montre que les chameaux vivant dans les

régions traversées par la vague épizootique de 1960 au Kenya n'ont jamais été malades et ne présentent pas d'anticorps. C'est pouvoir affirmer l'insensibilité du dromadaire à la peste bovine naturelle, mettant le point final à une longue controverse.

CHEZ LE GIBIER

Les données connues s'appliquent surtout à l'Afrique orientale, où les grandes antilopes et les buffles sont tenus pour responsables de la pérennité de la survivance du contagé dans la nature, alors que les gazelles se montrent très résistantes à la peste.

Une enquête sérologique effectuée au Kenya et au Tanganyika, a démontré que le schéma immunologique des groupes d'âge (adultes naturellement immuns et jeunes bénéficiant de l'immunité colostrale) était valable pour le gnou (espèce non représentée en Afrique centrale et occidentale) et le buffle. Il semble démontré (PLOWRIGHT, 1963) que des souches de virus pestique, stabilisées dans leur hypovirulence, infectent sans discrimination grandes antilopes, bovins et buffles, espèce chez laquelle les signes cliniques sont les plus sévères. Le danger représenté par la coexistence du gibier et du bétail est donc double : l'un est le réservoir de virus pour l'autre, réservoir de virus particulièrement inquiétant parce que ne donnant que des maladies larvées et pouvant prêter à la confusion clinique.

En dehors de cette enquête aucun fait nouveau saillant en ce domaine ne s'est fait jour ces années dernières en Afrique centrale et occidentale. Les troupeaux de grandes antilopes ne s'y rencontrent pas par centaines de milliers comme elles existent en Afrique orientale, où ils pacagent mêlés aux bovins. C'est pour cette raison qu'on doit toujours considérer comme vraie l'opinion de RECEVEUR (1954) selon laquelle dans le reste de l'Afrique le gibier n'est pas un réservoir de virus pour le bétail, mais que l'inverse (avant l'introduction des campagnes de vaccination massive) était exact.

En ces contrées, la disparition de la peste sur les bovins devrait entraîner sa disparition sur le gibier.

En conclusion de cette brève revue clinique, nous ne saurions trop insister sur l'intérêt qu'il y a pour le succès des campagnes de vaccination, à reconnaître la peste bovine dans sa nouvelle expression clinique et épizootologique, car les aspects peuvent en être trompeurs. L'attention devra également être attirée sur la possibilité d'infection des petits ruminants avec des souches adaptées à ces espèces.

III. — LES MALADIES « PESTIFORMES »

A côté des formes déroutantes que peut présenter la peste bovine, s'est fait jour une pathologie nouvelle, tout au moins dans sa reconnaissance clinique et virologique ; ses manifestations peuvent passer pour de la peste. Depuis 1947, un groupe de maladies connues en langue anglaise sous le nom de « *Mucosal Disease complex*, » ce que l'on traduit inélégamment en français par maladies des muqueuses, a été successivement décrit en Amérique du Nord, en Suède, en Angleterre, en Allemagne, en Australie, en France et tout récemment enfin en Afrique.

Y sont rangées l'entérite à virus et la rhinotrachéite bovine infectieuse, toutes deux viroses spécifiques de l'espèce bovine. Le coryza gangréneux peut à bon droit y être également inclus.

Frappantes dans leurs analogies cliniques avec la peste, touchant le même groupe d'âge que celui où se rencontre la peste bovine actuelle, ces maladies viennent singulièrement compliquer le diagnostic. La simple reconnaissance d'ulcères buccaux qu'accompagne une dysenterie n'autorise plus à afficher l'étiquette de peste sur un malade. Il nous faudra donc étudier en détail le diagnostic différentiel du typhus bovin, de ces maladies atteignant les muqueuses et des quelques autres affections qui s'en rapprochent.

Il semble, certes, que la fréquence de ces affections ne soit pas à l'heure actuelle particulièrement élevée en Afrique tropicale. Néanmoins l'expérience américaine a enseigné que leur importance était en fait insoupçonnée avant qu'on les découvrit. On doit se demander d'autre part, si, sur le continent africain, ce qui fut autrefois diagnostiqué comme étant des foyers sporadiques de peste

bovine n'était pas en fait l'une de ces affections des muqueuses. C'est ainsi qu'en 1914-1915, MONTGOMERY fut amené à étudier au Kenya une virose transmissible du bœuf, évoluant avec les caractères d'une peste d'une gravité moyenne sur des bovins vaccinés ou non contre la peste. Les travaux ne furent jamais repris, mais il est vraisemblable que l'auteur anglais eut affaire à une *mucosal disease* et que le continent africain est depuis longtemps infecté. La prudence et la rigueur diagnostique imposent donc de ne pas les négliger à l'avenir *.

IV. — LA DIFFICULTÉ DU DIAGNOSTIC

L'épizootologie et la clinique trompeuse de la peste bovine, l'existence de « maladies des muqueuses » ne sont pas une vue de l'esprit en Afrique centrale. Ce que nous venons d'exposer, c'est la pratique qui nous l'a dicté. Depuis plus de trois ans il est malaisé, dans le bassin du lac Tchad, de poser avec certitude un diagnostic clinique de peste bovine : tantôt on note sur quelques veaux non vaccinés des épisodes congestifs et diarrhéiques frustres, sans ulcérations buccales ; tantôt au contraire, ce sont des taureaux ou de vieilles vaches, vaccinés plusieurs fois au virus-vaccin capripéristique, qui présentent ulcérations buccales et diarrhée fusante.

Cette épizootologie et cette symptomatologie aberrantes nous ont inquiétés au début, car mettant en cause la valeur de la vaccination capripéristique, intrigués ensuite lorsque nous en avons abordé l'étiologie.

C'est ainsi que nous avons été amenés à explorer les méthodes précises du diagnostic expérimental, les confrontant aux données de la clinique. Le résultat en a été l'isolement de plusieurs souches hypovirulentes de virus bovipéristique sauvage chez des veaux et la reconnaissance clinique, puis virologique, de l'existence de la rhinotrachéite bovine et de l'entérite à virus.

C'est le fruit de notre expérience qui sera exposé maintenant d'une manière synthétique.

* Les virus viennent d'être isolés et authentifiés en Afrique centrale (Note des auteurs).

2^e PARTIE

DIAGNOSTIC CLINIQUE DIFFÉRENTIEL DE LA PESTE BOVINE ET DES MALADIES ATTEIGNANT LES MUQUEUSES

Ce n'est que pour mémoire que nous rappellerons l'évolution de la peste chez le bovin malade :

- phase d'invasion avec hyperthermie et un larmolement discret.
- phase des lésions externes, avec initialement la congestion des muqueuses externes, qui se couvrent de foyers punctiformes blanc-grisâtres se transformant ensuite en ulcères, tandis que s'intensifient le larmolement et le jetage qui deviennent peu à peu muco-purulents.
- phase gastro-intestinale, marquée essentiellement par la diarrhée souvent sanglante, au cours de laquelle l'état général s'altère profondément, amenant la mort en hypothermie et dans un état semi-comateux.

Sur le cadavre, on est frappé par la congestion des muqueuses du tractus digestif, les hémorragies qui s'y sont produites, accompagnées d'ulcérations dans la cavité buccale, la caillette, le cæcum et le colon. Les ganglions lymphatiques apparaissent congestionnés à la coupe.

Le diagnostic clinique et nécropsique se basant sur l'aspect des muqueuses du tube digestif, accessoirement sur celui des muqueuses conjonctivales et nasales, c'est sur ce plan que nous bâtirons le diagnostic clinique différentiel de la peste bovine et des maladies qui peuvent lui ressembler ou qui touchent peu ou prou les mêmes muqueuses qu'elle. Nous insisterons particulièrement sur les maladies classées dans le groupe des *mucosal diseases* dont nous ferons de courtes monographies.

A. — MALADIE CLINIQUEMENT SEMBLABLE A LA PESTE BOVINE

L'ENTÉRITE A VIRUS (*Virus Diarrhea*)

C'est une maladie aiguë et subaiguë, infectieuse, virulente, inoculable, propre à l'espèce bovine et due à la présence dans l'organisme d'un virus spécifique découvert en 1946 par OLAFSON, MAC CALLUM et FOX. Elle est caractérisée cliniquement par de la fièvre et une diarrhée profuse, et anatomiquement par des lésions congestives et ulcératives des muqueuses du tractus digestif, de la leucopénie et une hypertrophie des ganglions lymphatiques.

Historique et aire géographique. — En 1946, OLAFSON et ses collaborateurs décrivaient dans l'état de New-York une maladie contagieuse qui ressemblait étrangement, à la mortalité près, à la peste bovine. Des épreuves d'immunité croisée devaient rapidement lever le doute, mais l'alerte avait été chaude... Aucun germe visible n'étant présent, la maladie était rapportée comme étant due à un ultra-virus et les auteurs proposaient le nom de « Virus Diarrhea ».

Ce syndrome entérique était quelque temps plus tard décrit dans d'autres états d'Amérique du Nord (Maine, Colorado, Indiana), puis en Angleterre, en Suède, en Allemagne, en France et en Australie. SCOTT et BROWN ont fort opportunément rapporté en 1957, l'étude faite par MONTGOMERY en 1914-1915 au Kenya sur une maladie bovine ressemblant à la peste et évoluant sur du bétail immun de cette dernière maladie. De son côté, OTTE a décrit des affections cliniquement similaires en Ethiopie et au Soudan. Elles sont suspectées en Inde. GILLESPIE d'une part, KNASSIEFF d'autre part, montrèrent que le virus de l'entérite à virus est sérologiquement analogue à celui d'une autre maladie bovine décrite dans l'Iowa sous le nom de *Mucosal Disease*. Séparées cliniquement au début, il est certain maintenant que les deux affections entrent dans le même groupe nosologique ; il n'y a entre

l'entérite à virus et la *Mucosal Disease* qu'une question d'intensité des symptômes qu'expliquent des facteurs écologiques et raciaux différents.

Tout dernièrement enfin, deux groupes de chercheurs, l'un de Weybridge (Angleterre), l'autre de l'Université Cornell à New-York, ont rapproché le virus de l'entérite à virus de celui de la peste porcine : les deux virus ont des propriétés antigéniques communes et immunisent réciproquement l'un contre l'autre.

Maladie à l'origine américaine, l'entérite à virus voit donc son aire géographique singulièrement élargie ; sans beaucoup se tromper, on peut affirmer qu'elle est répartie dans le monde entier. L'isolement du virus reste à faire sur le continent africain, mais on peut être persuadé que ce n'est plus qu'une affaire de quelques mois.

Espèces affectées. — Dans les conditions naturelles, l'entérite à virus semble être une maladie spécifique des bovins, mais on l'a également authentifiée aux Etats-Unis sur des daims. Il est donc possible qu'on puisse la rencontrer un jour chez les antilopes africaines.

Expérimentalement, le virus est infectieux pour le mouton, le jeune porc et le lapin. Une souche atténuée par passage chez ce rongeur a été utilisée comme vaccin.

Epizootologie. — L'affection sévit en général sous une allure enzootique à la fin de l'hiver ou au printemps. Elle touche une exploitation, atteint les voisines, mais prend exceptionnellement un caractère explosif. La morbidité atteint 80 p. 100 des effectifs ; la mortalité varie suivant les régions de 5 à 50 p. 100 des malades. Il semble que les bouvillons de un à deux ans soient plus volontiers atteints ; la maladie est plus rare sur les veaux non sevrés. Les races à viande enfin se montrent plus réceptives que les laitières, observation toutefois plus relative qu'absolue.

Virologie. — Nos connaissances sont encore peu avancées. Le virus de l'entérite à virus * est filtrable et ultracentrifugeable (80-90 unités Svedberg) ; il a une forme sphérique et mesure 40 millimicrons. Il contient un acide ribonucléique et est inactivé par l'éther et le chloroforme, comme le sont ordinairement les lipovirus.

Sa résistance au froid est élevée. Il est détruit à 56 °C pendant 180 minutes, mais résiste à cette température pendant 30, 60 et 90 minutes. L'acidification du milieu à pH : 1,3 pendant 1 heure à 25 °C n'a pas d'effet sur sa virulence, mais l'alcalinisation le détruit. Il est inactivé par le formol à 2 p.100. Il n'hémasorbe pas les hématies de cobayes.

Cette fiche, encore trop incomplète, ne permet pas de le classer dans un groupe de virus.

La culture du virus se réalise : *in vivo* par inoculation intraveineuse à un veau de matériel virulent et en récoltant la rate à l'acmé de la réaction thermique.

In vitro sur couches monocellulaires de cultures de rein de veau ; certaines souches se montrent cytopathogènes (vacuolisation en fines bulles du cytoplasme), d'autres ne le sont pas. Les titres en virus varient de 10^5 à 10^7 unités virulentes par ml. Il est vraisemblable que le virus produit un interféron. La souche « Oregon C 24 V » est la plus communément employée pour la régularité de son action. Pathogène pour le veau à l'isolement et lors des premiers passages, le virus s'est atténué par 31 passages en série sur cellules embryonnaires bovines et peut être utilisé comme vaccin.

Le pouvoir pathogène du virus n'est patent que pour les bovins. Ceux de 8 à 24 mois sont les plus sensibles, et encore ne le sont-ils pas tous tant semblent être répandus le virus et l'immunité colostrale et naturelle qui en résultent. La production expérimentale de la maladie dans l'intégrité de son expression clinique est difficile : seules la fièvre diphasique et la leucopénie sont constantes, tandis que l'apparition de la diarrhée et l'inflammation des muqueuses visibles sont plus rares et sous la dépendance de facteurs encore inconnus.

Le lapin inoculé par voie veineuse, sans développement d'aucun trouble, conserve le virus vivant dans sa rate, ce qui permet de reproduire la maladie chez le veau. Soixante-quinze passages en série atténuent le virus.

* en abrégé : Virus VD.

PLANCHE I. — ENTÉRITE A VIRUS



Photo 1. — Aspect « pestique » d'un veau malade.



Photo 2. — Ulcérations du mufle.



Photo 3. — Ulcérations gingivales.



Photo 4. — Ulcérations gingivales.

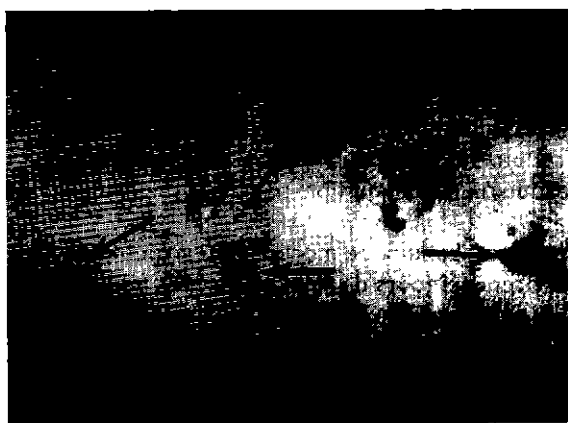


Photo 5. — Ulcérations de la surface dorsale de la langue.



Photo 6. — Ulcérations de la surface dorsale de la langue.

Photo 1 : extraite de *Vet. Med.*, 50 (10) : 431-34.

Photos 2, 3, 4, 5 et 6 : extraites de *Iowa State University Veterinarian* (1956) (F. K. RAMSEY. — Pathology of a mucosal disease).

L'ovoculture est incertaine et peu d'efforts ont à vrai dire été tentés car le virus se développe bien en cultures cellulaires.

Le *pouvoir antigène* du virus se manifeste chez les ovins par la formation d'anticorps neutralisant et précipitant, ces derniers pouvant être objectivés par la précipitation-diffusion en gélose. La mise en évidence des anticorps déviant le complément n'a pas connu de succès.

Les *propriétés immunologiques* du virus VD ont donné lieu à quelques controverses. Les différentes souches isolées par les premiers auteurs (souche New York, souche Indiana) semblaient être immunologiquement différentes, n'entraînant pas l'immunité l'une envers l'autre. De plus, on séparait ces deux souches d'un même virus de celles d'un autre virus que l'on rendait responsable du syndrome *Mucosal Disease*, syndrome voisin de l'entérite à virus, à l'intensité des symptômes près.

Il a depuis été démontré que les virus New-York, Indiana, Californie, Maine, Virginie, Iowa, aussi bien que ceux que l'on a pu isoler en Angleterre et en Allemagne, appartenaient au même type immunologique. Jusqu'à plus ample informé, les virus du syndrome « entérite à virus-mucosal disease » semblent être identiques.

Ils sont nettement séparés du groupe antigénique du virus de la peste bovine. Il n'y a entre eux aucune communauté sérologique, ni aucune immunité croisée. Les seuls rapports qu'ils entretiennent le sont par le biais d'une certaine similitude de la maladie clinique qu'ils déterminent sur le bétail. Curieuse et pleine de promesses virologiques et immunologiques est par contre la parenté sérologique qu'a mise en évidence DARBYSHIRE entre le virus de l'entérite à virus et celui de la peste porcine. Les lignes de précipitation en gélose sont identiques et inoculés respectivement chez leurs hôtes hétérologues, le virus VD protège le porc envers l'épreuve virulente de virus suipestique tandis que ce dernier virus immunise le veau vis-à-vis du virus VD. On devine immédiatement à quelles intéressantes applications cette découverte ouvre le champ.

Symptômes. — On distingue trois formes cliniques : une forme aiguë, une forme subaiguë ou clinique et une forme chronique.

Dans la *forme aiguë*, l'apparition des symptômes est brutale. On note de la fièvre assez élevée (40 °C), un catarrhe oculo-nasal, un peu de toux, un état de dépression très caractérisé et de l'anorexie. Les matières fécales sont généralement dures, noirâtres, recouvertes de mucus et de sang.

Ces symptômes persistent une semaine au cours de laquelle on assiste à une baisse puis à une remontée de la fièvre (courbe de température diphasique). Apparaît sur un certain nombre d'animaux (environ 50 p. 100) une congestion buccale, nasale et génitale très marquée qui laisse la place d'abord à de petites taches blanchâtres, puis à des érosions ulcéreuses qui vont s'étendant. Les ulcères, à bords nets et à fond plat rougeâtre, se rencontrent dans les naseaux, sur le mufle, sur les bourrelets, à l'intérieur des joues, sur le palais, les *faces dorsales et ventrales de la langue*. L'haleine est fétide. La sérosité nasale s'épaissit, devient visqueuse et en séchant adhère au mufle en y retenant des débris de fourrage. On observe parfois une opacité de la cornée et la présence de pityriasis notamment, dans la région cervicale (symptôme assez fréquemment retrouvé au Soudan).

La diarrhée apparaît à la fin de la première semaine de maladie. Au début les fèces sont liquides ; elles contiennent énormément de mucus et un peu de sang. Les animaux perdent rapidement du poids et se déshydratent très vite. Lorsque la mort doit se produire, la diarrhée ne cesse pas ; avant la fin on observe du ténésme. On note parfois de la boiterie due à une congestion podale et interdigitée. L'avortement peut se produire.

La maladie, sous cette forme, dure de deux à six semaines. Le taux de mortalité est variable de 5 à 50 p. 100. La mort survient ordinairement dans les dix premiers jours de la maladie chez les veaux emportés par la phase aiguë (et ceci est tout spécialement vrai lorsqu'existent des lésions muqueuses) ou bien elle est le fait d'une diarrhée de longue durée qui amène les animaux à la cachexie et à l'épuisement.

La *forme subaiguë* semble être très courante chez les veaux de moins de deux mois. Les animaux malades présentent un jetage liquide, une légère fièvre et un peu de diarrhée qui peut persister pendant quelques jours. Les lésions buccales sont rares et l'état général est peu affecté.

La *forme chronique* peut être primitive ou faire suite à la forme aiguë. Le début en est insidieux ; les animaux malades s'amaigrissent et présentent une diarrhée continuelle ou intermittente. S'il y a des ulcérations, elles traînent en longueur, convergent, s'étendent, s'infectent secondairement au niveau du pied. La congestion coronaire est fréquente ; le bourrelet se gonfle, suinte, en même temps que l'espace interdigité.

Le marasme entretenu par la diarrhée persistante où se rencontrent sang et fausses membranes, fait que les malades se cachectisent de plus en plus et succombent en cinq à six semaines.

Pronostic. — La forme aiguë, lorsqu'elle ne tue pas d'emblée les veaux, ne se traduit chez un bon nombre de sujets que par des lésions limitées qui peuvent guérir rapidement. Chaque animal est affecté durant huit à dix jours et l'effectif est libéré de la contagion en quatre à six semaines. Plus désastreuse en fin de compte est la *forme chronique traînant pendant de longs mois et ne laissant qu'une faible proportion de rescapés récupérables.*

Lésions. — Le cadavre est émacié, souillé de diarrhée. Les yeux sont enfoncés dans les orbites, le muflle recouvert de croûtes.

Lésions macroscopiques. Deux types de lésions sont à signaler : les lésions des muqueuses et celles des ganglions lymphatiques.

Sur *toutes* les muqueuses du tractus digestif existent de la congestion, des hémorragies, des érosions et des ulcérations. Ces dernières, allant du « coup d'ongle » à des larges placards, sont formées par l'abrasion de la couche épithéliale superficielle, laissant un chorion rougeâtre entouré d'une petite auréole inflammatoire. Ces ulcérations siègent dans toute la cavité buccale (avec une prédilection pour la lèvre inférieure et le palais), sur toute la langue, qui peut parfois prendre un aspect complètement desquamé. Dans l'œsophage, elles sont plus discrètes, mais dans la caillette on trouve de larges placards ulcérés surtout dans le fundus et près du pylore.

L'intestin grêle est peu touché et ne présente guère qu'une entérite mucoïde. Le gros intestin par contre est sévèrement atteint. On y trouve de larges taches hémorragiques sur la grande courbure à l'opposé de l'insertion mésentérique et tout autour de la valvule iléo-cœcale. Les plaques de Payer tranchent par leur couleur rouge sombre. Les plis du rectum sont le siège de suffusions sanguines plus ou moins accusées.

Les ganglions lymphatiques sont turgescents et congestionnés.

L'appareil respiratoire est rarement touché ; on n'observe qu'une congestion avec ulcères des naseaux, une rhinite catarrhale et un peu de congestion trachéale.

Lésions microscopiques. Elles sont du type dégénératif. Lors de la formation de l'ulcère, il y a d'abord une ballonnisation du protoplasme auquel fait suite la nécrose cellulaire, puis la desquamation. L'infiltration cellulaire ou leucocytaire n'est pas apparente. On ne note jamais la présence des cellules multinucléées comme dans la peste.

Les altérations des ganglions lymphatiques sont constituées par une disparition totale des cellules mononucléées du cortex. Il ne reste que la trame conjonctive.

Le *tableau hématologique* est dominé par la leucopénie. Elle apparaît au début de la maladie. Elle est, avec la fièvre diphasique, l'une des *plus sûres constantes symptomatologiques* de la maladie expérimentale.

Diagnostic. — Les *signes de suspicion* sont la fièvre, la déshydratation, la congestion et les ulcérations buccales, la diarrhée sanguinolente. On mesure d'emblée combien de points sont communs avec d'autres viroses.

Le diagnostic sera donc mené en trois étapes : clinique, nécropsique, expérimentale.

1. Diagnostic clinique. Le faisceau de signes critères évoqués plus haut devra être étayé par l'enquête épizootologique. Celle-ci est de la plus haute importance et permettra bien souvent de différencier l'entérite à virus de la peste bovine selon que l'affection évolue sur un troupeau vacciné ou non contre la peste. La qualité des vaccins antipestiques actuels et l'intensité des campagnes de vaccination doivent à eux seuls apporter une quasi-certitude.

Classiquement, la peste se montre plus rapide dans sa contagion et plus sévère dans sa clinique. A vrai dire, cette affirmation n'a rien de vrai de nos jours où les pestes torpides et bénignes sont le lot commun lorsqu'elles évoluent sur des bouvillons en état de semi-immunité. Toutefois un signe clinique est de la plus grande importance lorsqu'existent des ulcérations : *il n'y a jamais d'ulcérations sur la face dorsale de la langue dans la peste bovine alors qu'elles existent pratiquement toujours dans l'entérite à virus*. Rien d'autre dans les lésions ne peut permettre de distinguer les deux maladies.

Les aphtes, même rompus, de la *fièvre aphteuse*, ne seront pas confondus avec les ulcères de l'entérite à virus. L'atteinte podale (rarement mammaire sur le bétail zébu) aidera au diagnostic. La diarrhée enfin n'est pas un symptôme de la fièvre aphteuse.

L'absence de diarrhée, les symptômes oculaires (opacification cornéenne), la faible morbidité et la mortalité élevée du *coryza gangréneux* permettent de le différencier de l'entérite à virus.

Les *différentes stomatites* (stomatite papuleuse, stomatite vésiculeuse, nécrobacillose ou diphtérie des veaux) évoluent toutes sans diarrhée et ont des caractères particuliers.

La *blue tongue* n'a pas encore été rapportée en Afrique centrale, mais elle pourrait s'y introduire. Chez les bovins, elle risque d'en imposer dans ses diverses localisations au stade ulcéreux (inflammation localisée de la langue avec nécrose des muqueuses buccale et nasale) mais la diarrhée manque.

La *maladie des radiations atomiques* sera essentiellement hémorragique, sans diarrhée.

La *maladie de Johne* a une épizootiologie particulière et n'a pas encore été signalée en Afrique centrale.

La *coccidiose* est éliminée par l'absence de congestion et d'érosions buccales. Il ne faut pas oublier que la présence de coccidies n'élimine pas une entérite à virus (non plus que la peste).

Les *salmonelloses* peuvent prêter à confusion, mais les lésions sont limitées à l'intestin. L'isolement du germe permet le diagnostic.

2. Diagnostic nécropsique. Il est basé sur la constatation des lésions décrites. Il est habituellement si frappant qu'il faut prendre bien garde de ne pas porter d'emblée le diagnostic de peste. Seul l'examen de la langue sur toutes ses faces permettra de lever le doute.

3. Diagnostic expérimental. L'inoculation à un autre bovin est une épreuve sûre. A partir d'inoculats variés : matériel fécal, sang, suspension de tissu splénique, on reproduit une maladie, constante dans ses deux expressions : hyperthermie et leucopénie, plus rare avec le cortège ulcératif et diarrhéique.

Un test de précipitation en gélose a été récemment décrit. Il utilise comme antigène les tissus touchés par le virus : muqueuse buccale, muqueuse jugale (excellente), muqueuse pharyngée, muqueuse intestinale qui sont broyées après prélèvement, et le broyat est placé dans l'une des cupules de boîtes de Pétri remplies de gélose. L'antisérum provient d'un animal malade, mais on peut mettre à profit la communauté antigénique avec le virus suipestique et utiliser un hyperimmun sérum contre la peste porcine. La réaction positive se traduit, après 24 heures d'incubation à température ordinaire, par une ligne de précipitation entre les deux réservoirs.

Etiologie. — 1. *Matières virulentes.* Ce sont le jetage, les fèces, et expérimentalement le sang et la rate. Les matières fécales restent longtemps virulentes (5 mois).

2. *Résistance du virus.* Le virus n'est pas très résistant et est inactivé rapidement par la chaleur. Au froid, il se conserve aisément à — 40 °C mais il est rapidement détruit à — 20 °C.

3. *Réceptivité.* L'espèce joue un rôle primordial : seuls les bovins et le daim sont, dans les conditions naturelles, sensibles au virus. La race et le sexe ne semblent pas avoir d'influence. L'âge conditionne plus sûrement la réceptivité : les très jeunes et les sujets âgés sont résistants ; les plus sensibles sont les bovins âgés de 8 à 24 mois ; ils présentent les symptômes les plus marqués.

4. *Mode de contagion.* Elle est assurée par le contact direct, moins sûrement par le contact indirect. On a pu remarquer que le fait d'intercaler dans une étable des animaux âgés entre les veaux à

l'attache faisait cesser l'extension de la maladie chez ces derniers. Dans les conditions naturelles la transmission du contagé se fait au pâturage.

Pathogénie. — Aucune notion précise n'est connue, en dehors du tropisme du virus pour les lymphocytes.

Prophylaxie. — Les mesures de prophylaxie sanitaire sont celles ordinairement prises dans toute maladie contagieuse.

La prophylaxie médicale fait appel à la vaccination par virus vivant. Elle est parfaitement justifiée en certains pays comme ceux de l'est des Etats-Unis où les pertes économiques que cause l'entérite à virus sont importantes. Il existe deux vaccins :

— Vaccin lapinisé. Il est préparé à partir de rates de lapins infectés par le virus VD souche New York 1, atténué par un minimum de 75 passages en série chez le lapin.

La vaccination se fait au sevrage. Il n'y a qu'une réaction thermique insignifiante et pas de leucopénie. L'immunité est d'excellente qualité mais on ne sait encore rien sur sa durée.

— Vaccin de culture cellulaire. Il est préparé sur cellules de rein de veau avec la souche Oregon C 24 V atténuée par 32 passages en cultures. Le vaccin s'emploie comme le précédent et ne donne aucune réaction vaccinale. L'immunité est solide mais on ne connaît pas sa durée.

B. — AFFECTIONS ATTEIGNANT LA MUQUEUSE BUCCALE

Nous avons déjà évoqué certaines stomatites lors du diagnostic clinique de l'entérite à virus. Nous en préciserons ici quelques modalités cliniques qui aideront à leur reconnaissance.

I. — FIÈVRE APHTEUSE

Diagnostic épizootiologique. La contagiosité de la fièvre aphteuse est plus subtile que celle de la peste. En quelques semaines, elle s'étend à une région naturelle ; en quelques mois, elle touche tout un territoire. C'est ainsi qu'en 1960, le Tchad fut entièrement contaminé du nord au sud en l'espace de deux mois par un virus du type A*.

En Afrique occidentale et centrale, elle frappe par vagues épizootiques espacées de plusieurs années, dont la caractéristique est de toucher pratiquement tous les bovins quel que soit leur âge.

Ces deux caractères : haute contagiosité et réceptivité indépendante de l'âge, la distinguent déjà nettement de la peste bovine.

Diagnostic clinique. La prostration qui a fait donner à la peste classique le nom de « typhus bovin » n'existe pas sur le bétail zébu atteint de fièvre aphteuse.

La trilogie symptomatologique des lésions buccales, podales et mammaires souffre également quelque exception : si les lésions buccales et surtout podales sont constantes, les lésions mammaires sont beaucoup plus rares. Bien souvent l'attention de l'éleveur n'est attirée que par la douleur podale des animaux, qui par ailleurs ont conservé leur appétit. Chez les veaux la douleur buccale peut empêcher la tétée et entraîner la mort par inanition. La présence d'aphtes dans l'espace interdigité permet d'emblée d'éliminer la peste bovine du diagnostic.

Les caractères de l'éruption aphteuse sont par ailleurs très particuliers : en dehors de leurs localisations labiales, gingivales et palatines, les aphtes apparaissent volontiers sur la face dorsale de la langue, ainsi qu'à l'extrémité libre de cet organe ; nous savons que les ulcères pestiques ne s'y rencontrent que sur la face ventrale.

L'aphte non rupturé est caractéristique mais difficile à saisir dans son évolution, car fugace est sa présence ; il faut examiner un grand nombre d'animaux pour avoir la possibilité de l'observer. Il se différencie aisément d'une érosion pestique où domine l'enduit pultacé.

* En trois mois, une vague épizootique à virus SAT 1 a déferlé d'est en ouest sur le pays durant l'année 1963.

PLANCHE 2.

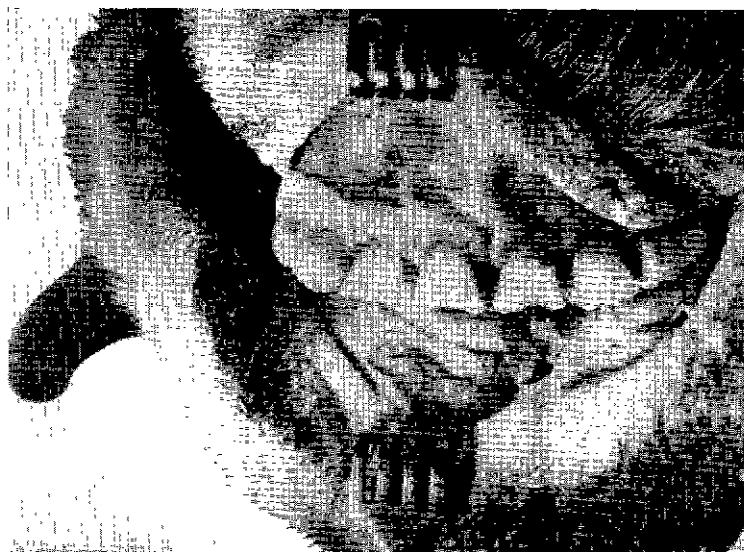


Photo 7. — Fièvre aphteuse — Lésions gingivales.



Photo 8. — Fièvre aphteuse — Lésions linguales.

La présence d'aphtes rupturés ne doit pas induire le clinicien en erreur : les bords en sont exfoliés ; il reste toujours quelques lambeaux de l'épithélium de l'aphte. Différent est l'ulcère pestique, à bords francs, à fond rougeâtre que recouvre un magma caséeux.

La diarrhée enfin n'est pas commune dans la fièvre aphteuse alors qu'elle est un symptôme cardinal dans la peste.

Diagnostic nécropsique. Il est particulièrement aisé, les lésions de la fièvre aphteuse étant limitées à la cavité buccale.

2. — STOMATITE VÉSICULEUSE

La stomatite vésiculeuse, virose *commune* au cheval, aux bovins, au porc, et à l'homme, ne semble jamais avoir été signalée en Afrique en tant qu'entité morbide définie.

Sa symptomatologie est singulièrement semblable à celle de la fièvre aphteuse, hormis la bénignité de son évolution. Sur le bétail zébu, on peut penser qu'on ne saurait les différencier cliniquement.

Les éléments du diagnostic différentiel de la peste bovine donnés pour la fièvre aphteuse s'appliquent ici. La concomitance d'une éruption vésiculaire épithéliale sur les chevaux pourrait la faire suspecter ; le diagnostic exact appelle le recours au laboratoire.

3. — BLUE TONGUE

Dans les régions où sévit l'épizootie, cette virose du mouton évolue chez le bœuf sans donner la plupart du temps de symptômes cliniques. La maladie bovine a néanmoins été décrite en Afrique du Sud, au Portugal, en Espagne, et aux Etats-Unis. Connu depuis 1923 en Afrique occidentale, l'isolement récent du virus de la blue-tongue en Nigeria du Nord (1958) peut faire craindre une flambée de la maladie chez les bovins d'Afrique centrale, comme ce fut le cas en 1935 en Afrique du Sud et en 1957 en Espagne. Il importe donc de savoir reconnaître la maladie bovine.

Diagnostic épizootiologique. La maladie bovine ne se verra que concomitante ou subséquente à la maladie ovine. Ce sera une maladie de début de la saison des pluies, sévissant de préférence dans les régions marécageuses où l'eau stagnante se prête à la prolifération des *Aedes* et *Culicoides*, vecteurs du virus.

Diagnostic clinique. Les rares bovins présentant des symptômes cliniques de blue-tongue montrent une inflammation des muqueuses buccales et nasales suivie de nécrose. Il n'y a pas de localisation en ulcères comme dans la peste.

En même temps qu'apparaissent ces lésions nasales et buccales, on note un œdème de la mamelle qui se congestionne et peut manifester de la nécrose superficielle. La sécrétion lactée se tarit.

Le processus congestif atteint parfois le pied, avec rubescence du podophylle et de la couronne, puis nécrose, décollement et chute des onglons.

Ces atteintes mammaires et podales sont totalement inconnues dans la peste. Enfin, *la blue-tongue bovine n'est jamais mortelle.*

Diagnostic expérimental. Il est fondé sur la mise en évidence du virus ou des anticorps sériques chez les convalescents.

L'isolement du virus se fait en inoculant du sang citraté dilué au 1/10, soit à un mouton d'un an environ chez qui devra évoluer la maladie typique de la « langue bleue », soit à des cultures cellulaires de rein d'agneau, à l'œuf de poule embryonné, aux souriceaux ou aux hamsters nouveau-nés.

La sérologie recherchera dans deux prélèvements de sérum sur le même animal (l'un à l'acmé de la maladie, l'autre trois semaines plus tard) une montée d'anticorps neutralisant le virus en cultures cellulaires ou sur œuf embryonné, ou d'anticorps déviant le complément.

En tout état de cause, le diagnostic de blue-tongue bovine ne peut être qu'un diagnostic d'exception.

PLANCHE 3.



Photo 9. — Stomatite papuleuse — Lésions gingivales*.



Photo 10. — Stomatite papuleuse — Lésions gingivo-palatines*.

* Clichés Mackowiack.

4. — STOMATITE PAPULEUSE

La stomatite papuleuse est une maladie infectieuse, contagieuse, *récurrente*, spéciale aux bovins. Elle est due à un virus spécifique, classé dans le groupe des poxvirus à côté de celui de l'ecthyma contagieux.

Elle est extrêmement fréquente en Afrique.

Epizootologie. La maladie atteint les bovins sans distinction d'âge, des jeunes à la mamelle aux adultes. Une première attaque ne confère pas l'immunité et il n'est pas rare de voir plusieurs vagues successives d'éruption. Dans un troupeau sa marche est extrêmement rapide, et son évolution bénigne. Elle peut coexister avec la peste bovine.

Symptômes. Il n'y a aucune élévation thermique, ni aucun abattement. Seuls les animaux les plus atteints présentent un peu de dysphagie pendant quelques jours à cause de la douleur buccale.

On note à l'inspection du mufle des croûtes brunâtres, circulaires, de quelques millimètres à un centimètre de diamètre. Ces croûtes entourées d'un anneau congestif ou jaunâtre se retrouvent sur le bord des naseaux, aux commissures labiales et sur la lèvre inférieure. Lorsqu'on les détache, elles laissent une surface congestionnée et saignante, à bords francs et en surplomb (planche 2).

Des lésions de type identique se révèlent à l'inspection de la bouche, sur la gencive inférieure, où elles ont un lieu de prédilection à la base de la troisième incisive, sur la gencive supérieure, sur les faces internes des lèvres, plus rarement sur les deux faces de la langue. Sur le palais, elles prennent volontiers l'aspect de larges plaques transversales. Les croûtes tombent rapidement, laissant une plaque ulcérée à bord franc, parfois recouverte d'un enduit pultacé blanchâtre non fétide. Ces ulcères, sans tendance à l'extension, prennent parfois un aspect cratériforme et cicatrisent en quelques jours par régénération de l'épithélium.

Il n'y a ni rhinite, ni conjonctivite, ni diarrhée.

La présence de croûtes, l'évolution bénigne distinguent nettement la stomatite papuleuse de la peste. Toutefois, la présence d'ulcères buccaux doit faire soupçonner cette dernière maladie ; l'examen d'autres animaux du troupeau, l'évolution ultérieure renseigneront.

5. — DIPHTÉRIE BOVINE OU NÉCROBACILLOSE

Le bacille de la nécrose, *Spherophorus necrophorus*, ou bacille de Schmorl, provoque diverses infections suppuratives des bovidés et des ovidés et est également reconnu comme l'agent étiologique principal de la diphthérie du veau.

Cette maladie du jeune veau de huit jours à trois mois ne prend pas des allures d'épizootie. Elle est rarement rapportée en Afrique, où son agent étiologique cause cependant des infections spécifiques (inflammation du canal biflexe du mouton...)

Diagnostic épizootologique. Cas isolés ou en tout petits foyers uniquement sur les veaux. En même temps peuvent exister des abcès interdigités sur les bêtes adultes.

Diagnostic clinique. Anorexie due à la douleur buccale. La muqueuse des joues, du palais et de la langue se couvre de taches grisâtres qui se transforment, les jours suivants, en dépôts rugueux, gaufrés, jaunâtres, en surplomb sur la région avoisinante. Les fausses membranes tombent, laissant une muqueuse ulcérée en larges plaques d'aspect livide. La salive s'écoule à l'extérieur, entraînant des sphacèles nécrosés. Le processus peut atteindre les cavités nasales et touche très souvent le larynx, entraînant un tirage respiratoire et des accès de toux et de suffocation.

Le tableau clinique, la présence de fausses membranes, séparent nettement cette maladie de la peste bovine.

6. — STOMATITES DIVERSES

Nous citerons pour mémoire :

— la stomatite traumatique, que l'on rencontre chez les veaux au sevrage broutant le fourrage dur de la saison sèche.

— les stomatites dues à divers produits chimiques dont la rareté dans la vie pastorale africaine réduit singulièrement cette catégorie d'affection.

— la stomatite pseudo-aphteuse épidémique de Mollaret et Salomon, virose bénigne évoluant avec l'apparition de lésions éruptives buccales de courte durée.

— éventualité rare, les brûlures par ypérite pourraient en imposer pour des ulcères pestiques. Le contexte épizootologique apporte des renseignements et les brûlures dues à l'ypérite * sont confinées aux premières parties du tractus digestif.

— la maladie de la bombe atomique où l'exposition plus occulte à des radiations ionisantes α , β et γ produit chez les bovins, en dehors des brûlures externes et d'alopécies localisées, des érosions et des ulcères de tout le tractus digestif qu'accompagnent des hémorragies rénales et pelviennes. La lymphopénie est intense. Ce tableau lésionnel se retrouverait avec plus d'intensité encore chez les porcs et surtout les chèvres, espèces qui ne font habituellement en Afrique qu'une peste bovine asymptomatique.

C. — AFFECTIONS ATTEIGNANT LA MUQUEUSE CONJONCTIVALE

L'atteinte conjonctivale avec larmoiement abondant est pratiquement constante dans la peste bovine à son début.

Elle se voit dans de nombreuses maladies infectieuses bovines, comme l'entérite à virus, la rhino-trachéite infectieuse, le coryza gangréneux, et les rickettsioses bovines, comme la maladie d'On-diri ou purpura hémorragique infectieux.

Il faut signaler pour mémoire l'action traumatisante du nématode *Thelazia rhodesiense* qui peut parasiter les culs-de-sacs conjonctivaux.

On différenciera les conjonctivites et kératites banales, contagieuses ou non, d'étiologie bactérienne ou rickettsienne.

D. — AFFECTIONS ATTEIGNANT LES MUQUEUSES RESPIRATOIRES

En dehors de quelques formes atypiques rapportées en Egypte, la peste bovine ne touche pas les poumons. Cependant, il existe dans le cortège symptomatologique de la peste, une importante part jouée par le jetage nasal qui, se desséchant et obstruant les naseaux, contribue à donner au bovin malade son aspect de « typhique ».

A l'autopsie, on trouve les cornets nasaux et le septum recouverts d'un muco-pus adhérent qui cache une muqueuse pétéchiale. Les lésions de la muqueuse buccale s'étendent au larynx et la trachée présente, signe invariable, des bandes longitudinales hémorragiques.

Il y a plusieurs maladies qui présentent cet aspect clinique et ces lésions, avec en tout premier lieu : la rhinotrachéite bovine infectieuse **. Le coryza gangréneux peut en imposer. La nécrobacillose s'en distinguera plus aisément.

1. — LA RHINO-TRACHÉITE BOVINE INFECTIEUSE

Maladie infectieuse, virulente, contagieuse et inoculable due à un virus isolé par MADIN, YORK et Mc KERCHER en 1956.

La maladie est caractérisée cliniquement par de la fièvre, l'hyperémie des muqueuses des premières voies respiratoires et l'écoulement d'un exsudat des cavités nasales ; anatomiquement, par des lésions de rhinite, de trachéite, de laryngite.

* Gaz de combat vésicant utilisé en Europe pendant la guerre 1914-18.

** en abréviation RBI

PLANCHE 4.



Photo 11. — Stomatite papuleuse — Lésions du mufle.

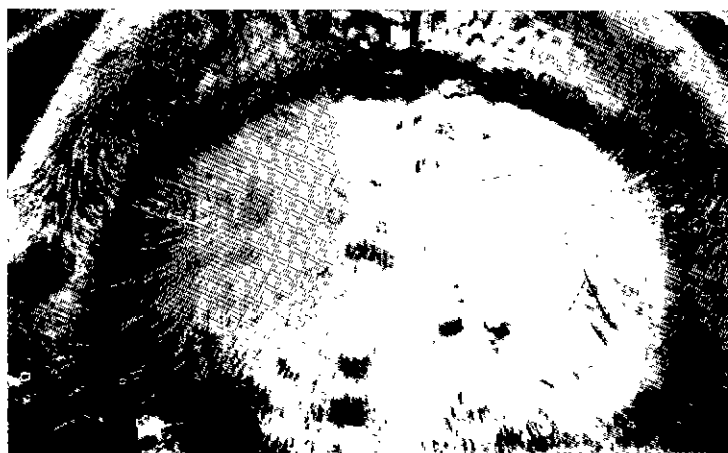


Photo 12. — Stomatite papuleuse — Lésions labiales.

Photos 11 et 12 extraites de *Am. J. vet. Res.* 1961, 22 (38) : 473-81.

Historique et aire géographique. — C'est en 1950 qu'au Colorado a été cliniquement décrite une nouvelle entité morbide se traduisant par une violente inflammation des voies aériennes supérieures, accompagnée d'un coryza important. La maladie fut reconnue dans tous les Etats de l'Ouest américain sur le bétail destiné à l'embouche (1953), puis dans ceux de l'Est sur le bétail laitier (1957) ; on doit considérer que tout le continent nord-américain, Canada y compris, est infecté. Son nom lui a été donné en 1957, année où elle fut détachée du groupe « Mucosal disease complex » où elle était jusqu'alors incluse.

GILLEPSIE montra en 1958 l'identité du virus de la RBI avec celui de la vaginite granuleuse ; un seul et même virus est l'agent étiologique de deux maladies bovines cliniquement très différentes.

Le virus RBI a été isolé et étudié en Allemagne en 1959, la même année en Nouvelle-Zélande, et en Angleterre tout récemment (1962). Des sondages sérologiques effectués en France montrent que le bétail français possède des anticorps neutralisants et se trouve donc infecté.

La maladie existe en Afrique centrale ; le virus n'a pas encore été isolé mais un syndrome identique à la RBI a été observé tout autour du Lac Tchad*.

Espèces affectées. — Dans les conditions naturelles, la RBI ne touche que les bovins.

Expérimentalement un syndrome fébrile est reproduit chez le chevreau. Le cheval et le mouton sont totalement réfractaires à l'inoculation, mais ils fabriquent des anticorps neutralisant à un taux significatif. Le lapin développe une lésion localisée au point d'inoculation intradermique.

Epizootologie. — La rhinotrachéite est une maladie grave du bétail d'embouche. Aux Etats-Unis, elle apparaît par véritables vagues épizootiques sur le bétail des « feed-lots » : ce sont des bovins de quatre à cinq ans achetés dans des ranchs, parqués par plusieurs milliers, et engraisés avant d'être envoyés à la boucherie. Dans ces parcs, de l'introduction de bovins malades résulte une contagion qui s'étend généralement à l'ensemble des animaux. La maladie existe aussi, plus larvée, sur le bétail de ranch. Le bétail laitier fait des formes plus frustes. Chez eux, la maladie se déclare souvent après l'introduction dans l'étable d'un bovin nouvellement acheté.

En Afrique centrale, on la voit évoluer dans les troupeaux de veaux que l'on constitue après le sevrage des animaux ; son évolution y est bénigne.

L'immunité suit une première atteinte de la maladie. La RBI n'est pas une maladie de saison froide comme on pourrait s'y attendre. Au contraire, sa plus grande fréquence se situe à la fin de l'été et au début de l'automne.

La morbidité varie de 10 à 20 p. 100 du troupeau, la mortalité de 3 à 10 p. 100 des malades.

Virologie. — L'agent étiologique de la RBI est un ultra-virus. Sa forme est sphérique et sa taille oscille autour de 150 m μ . Il est formé d'un matériel interne sphérique (le nucléoïde viral) de 45 m μ de diamètre ; une double membrane entoure le nucléoïde.

Ce nucléoïde est formé d'un seul acide nucléique qui est un acide désoxyribonucléique.

Ces caractères morphologiques, étayés de la stabilité chimique et des lésions cellulaires déterminées en cultures, font ranger le virus dans le groupe des Herpès ou Nitavirus (qui comprend le virus de l'herpès, de la varicelle, le virus B du singe, le virus de l'avortement des juments et le virus d'Aujeszky).

Le virus est relativement thermostable : il reste entièrement viable après congélation à — 60° et son titre ne baisse que de peu après un mois au réfrigérateur. Par contre, il est détruit en 50 jours à 22 °C, 10 jours à 37 °C et 21 minutes à 56 °C. La lyophilisation le conserve.

Le virus est inactivé en 1 minute par l'éther, l'acétone et l'alcool éthylique. Il est inactivé en 24 heures par la solution de formol au 1/500 et en 96 heures par celle au 1/5000. Il reste stable entre les pH 6 et 8, mais il est inactivé au-dessous de pH 6. Il n'héماغglutine les hématies d'aucune espèce.

La culture du virus se réalise aisément *in vitro*. Un grand nombre de tissus sont sensibles, ne reflétant pas ainsi la stricte spécificité de la maladie bovine : cellules humaines normales ou cancéreuses,

* Tout récemment (juillet 1963), le virus a été isolé au Tchad sur des bovins, présentant à la fois les symptômes de rhinotrachéite et de vaginite granuleuse.



Photo 13. — Rhinotrachéite bovine.



Photo 14. — Rhinotrachéite bovine.



Photo 15. — Coryza gangréneux.

Photos 13 et 14 : extraites de *Dtsch. tierärztl. Wochr.*
Photo 15 : extraite de *Vet. Med.* 1959, 54 (10) : 509-12.

cellules de rein de porc, de veau, de chèvre, de mouton, de cheval, de chien, testicule de lapin... Il ne se multiplie pas en fibroblastes de poulet (pas plus que dans l'œuf embryonné). Dans tous ces systèmes cellulaires, le virus détermine un effet cytopathique particulier des cellules infectées : des inclusions rondes intranucléaires (inclusions intranucléaires du type A de Cowdry) apparaissent. Ensuite les cellules s'arrondissent, deviennent granuleuses ; la culture se lyse en 72-96 heures.

Le pouvoir pathogène du virus n'est patent que pour le bœuf. La maladie est reproduite par badiageonnage de la muqueuse nasale, inoculations intratrachéales ou aérosols de produits virulents ou du virus de culture. La maladie clinique est reproduite avec ses symptômes. L'inoculation intramusculaire ne reproduit pas la maladie mais entraîne l'immunité. Il n'y a pas d'animal expérimental, hors le chevreau de peu d'utilité.

Les propriétés antigéniques du virus RBI n'ont fait l'objet que de quelques études. Un seul type antigénique a été isolé jusqu'à présent de par le monde. Le virus de la RBI a une communauté sérologique avec celui de l'avortement des juments (virus de Dimock et Edwards ou *equine rhinopneumonitis virus*). Ils donnent naissance à des anticorps déviant le complément et précipitant pour l'un ou l'autre virus, mais les anticorps neutralisants sont spécifiques. Les deux virus ont donc des relations antigéniques mais non immunologiques.

Les propriétés immunogènes sont objectivées par l'immunité solide et durable (au moins 2 ans) qui suit une première atteinte de la maladie. Cette immunité se reflète dans l'existence d'anticorps sériques neutralisant le virus, mais dont le titre chez un même animal est sujet à de grandes fluctuations sans que pour cela baisse l'immunité à l'inoculation d'épreuve.

Symptômes. — Après une période d'incubation variable de 10 jours à plusieurs mois après l'introduction du contagion dans un troupeau par un bovin étranger, la maladie se présente sous deux aspects : grave ou bénin.

— *Allure grave.* Le début de la maladie est brutal et est marqué par une forte fièvre (41-42 °C). Pendant un à deux jours, l'habitus n'est pas changé. Puis apparaissent une congestion et un catarrhe nasal, une sialorrhée intense et une accélération de la respiration. On peut en même temps observer une conjonctivite.

La dyspnée va s'accroissant tandis que s'épaissit la décharge nasale. La toux peut exister mais n'est pas constante. La muqueuse visible des cavités nasales est hyperémisée, et dans les 48 heures suivantes peut se marquer de zones de nécrose qui se transformeront en ulcères (planche 3).

Ces manifestations locales s'accompagnent de symptômes généraux : suppression de l'appétit, déshydratation, cessation totale de la sécrétion lactée.

La mort peut se produire brusquement dès ce stade par complications pulmonaires, mais dans la grande majorité des cas les symptômes commencent à s'amender. Chez d'autres, la sérosité nasale devient mucopurulente, puis purulente et la maladie suit un cours lent qui les conduit au marasme et à la mort.

Chez les vaches laitières, il y a parfois un emphysème sous-cutané rétroscapulaire et abdominal. L'avortement peut survenir chez les femelles. La durée totale de la maladie est de dix à quinze jours.

— *Allure bénigne* (maladie africaine). Elle se traduit par une température élevée pendant quelques heures, un catarrhe nasal pendant quelques jours, puis tout rentre dans l'ordre. C'est ce que l'on obtient dans la maladie expérimentale.

L'allure générale de la RBI non compliquée est celle d'une inflammation catarrhale des premières voies respiratoires. Il n'y a jamais, ni érosions buccales ni diarrhée.

Lésions. — 1. *Macroscopiques.* Elles siègent dans les voies respiratoires supérieures.

On relève une congestion intense de la muqueuse nasale avec parfois des pétéchies. L'exsudat est clair dans les cas bénins, mais fibrinopurulent, dense, collé à la paroi et pouvant obstruer tout le conduit nasal dans les cas graves. Il se rencontre également dans les sinus.

Cette congestion, ces pétéchies et ces dépôts purulents se retrouvent jusque dans la trachée. Par contre ce n'est que lorsque la mort est due à une pneumonie bactérienne secondaire que les poumons sont atteints ; en règle générale, ils sont normaux.

2. *Microscopiques.* On retrouve dans les muqueuses touchées des lésions d'œdème, et la sous-muqueuse est infiltrée de lymphocytes et de macrophages. Mais le fait le plus saillant est la présence d'inclusions intranucléaires éosinophiles du type A Cowdry dans les cellules de la muqueuse nasale ; elles sont d'apparition précoce mais de peu de durée et ne sont bien mises en évidence que sur les coupes fixées au Bouin et non au formol.

Pronostic. — Il est plus grave économiquement par le nombre d'animaux qu'il touche, la perte de poids qu'entraîne la maladie, la longueur de la convalescence, que par la mortalité.

Diagnostic. — 1. *Diagnostic clinique.* Dans les régions où sévit habituellement la maladie, le diagnostic est aisé. Il repose sur la constatation d'une hyperthermie brutale qu'accompagne un catarrhe nasal abondant, de la congestion des muqueuses nasales et de la dyspnée.

Dans les régions où elle n'a pas encore été signalée, on éliminera :

La *nécrobacillose* à forme laryngée, de diagnostic difficile lorsque ne coexistent pas les lésions buccales. La contagion renseignera utilement : grande dans les cas de RBI, cas disséminés dans le cas de *nécrobacillose*.

L'*entérite à virus*, la *peste bovine* ont des tropismes plus nettement intestinaux.

La *fièvre de transport* pose un cas délicat, mais l'atteinte pulmonaire est plus intense.

Dans le *coryza gangréneux*, il y a un état de « *tuphos* » initial qui n'existe pas dans la RBI. Les symptômes oculaires, puis encéphalitiques, la douleur à la percussion de la tête, l'évolution toujours mortelle en 48 heures à 12 jours signent le *coryza gangréneux* qui évolue par ailleurs par cas sporadiques.

2. *Diagnostic expérimental.* Il repose sur :

— l'isolement du virus, relativement aisé en cultures cellulaires à partir du liquide de sécrétion nasal ou d'un écouvillonnage des fosses nasales. Ces liquides seront additionnés de 1.000 unités de pénicilline et 1.000 µg de streptomycine par millilitre et envoyés sous froid au laboratoire. L'ensemencement sur cellules de rein d'embryon de veau, la constatation des lésions cytopathiques et de leur inhibition par un immunosérum authentifieront le virus.

— les méthodes immunologiques, qui en comparant la teneur en anticorps neutralisant de deux prélèvements de sérums (l'un à l'acmé de la maladie, l'autre trois semaines plus tard), mettront en évidence une montée des anticorps.

Étiologie. — 1. *Matières virulentes.* Seules les sécrétions nasales sont virulentes. Le sang, la rate, ne le sont jamais.

2. *Résistance du virus.* Il n'a pas de résistance dans le milieu extérieur et s'il est déposé sur les fourrages, ces derniers doivent venir très rapidement en contact avec des animaux sains pour pouvoir véhiculer le contagé.

3. *Réceptivité.* Seule l'espèce bovine est réceptive.

L'influence de la race est incertaine et si l'on accuse une plus grande réceptivité des races à viande, cela doit tenir au mode d'élevage. Expérimentalement, les veaux des races laitières se sont révélés très sensibles.

Le sexe n'a aucune influence. L'âge doit en avoir peu, et la raison invoquée plus haut (les animaux que l'on engraisse sont de jeunes adultes) explique la prévalence dans ce groupe d'âge. Expérimentalement les veaux de six semaines se sont montrés réceptifs.

4. *Modes de contagion.* La RBI est contagieuse et se transmet d'animal à animal dans les parquets d'engraissement des *feed-lots*. La maladie suit généralement l'introduction dans le troupeau d'un cas subclinique, mais il est fort probable également qu'existent d'authentiques excréteurs de virus, anciens malades guéris, qui entretiennent le virus en un site organique autre que les cavités nasales (muqueuse vaginale chez les femelles, où elle donnerait les symptômes frustes d'une vaginite granuleuse). Sous l'action de stress divers (transport, changement alimentaire), ils excréteraient leur virus et contamineraient leurs congénères.

5. *Voies de pénétration.* Dans les conditions naturelles comme dans les conditions expérimentales, la voie nasale semble être la seule voie de pénétration du virus.

Prophylaxie. — Les recommandations de prophylaxie sanitaire, difficiles à mettre en œuvre, semblent illusoire à formuler.

Une immunité solide, de deux ans au moins de durée, suit la maladie ; les bovins sont alors réfractaires, soit à la maladie naturelle, soit à la maladie expérimentale. C'est sur cette constatation que se fondent la prophylaxie médicale et l'application de la vaccination. Les vaccins employés sont de deux types.

1. *Vaccin vivant.* Le virus de la RBI, cultivé sur cellules de rein d'embryon de veau, cellules de rein de porc ou de chien, confère l'immunité sans reproduire la maladie clinique quand on l'inocule par voie *intra-musculaire*. Les vaccins ainsi préparés sont présentés sous forme lyophilisée. Ils sont d'une innocuité et d'une efficacité parfaites. La vaccination des bovins d'emboche de l'ouest des Etats-Unis, est maintenant généralisée.

2. *Vaccin inactivé.* Le virus est cultivé en cellules bovines de la même manière que pour le vaccin vivant, puis il est inactivé par le formol et combiné à un adjuvant de l'immunité (adjuvant de Freund). Ce vaccin serait plus spécialement destiné aux vaches reproductrices car le vaccin vivant a été accusé, à tort semble-t-il, de provoquer parfois l'avortement.

Traitement. — Les antibiotiques sont indiqués pour lutter contre les infections bactériennes secondaires et éviter l'atteinte du poumon.

Des antihistaminiques seront injectés pour diminuer la congestion nasale et des irrigations de préparations enzymatiques (dornase pancréatique) afin de fluidifier les sécrétions et digérer les débris, seront faites localement.

2. — CORYZA GANGRÉNEUX

Le coryza gangréneux des bovidés est mondialement connu ; il existe en Afrique, tout spécialement en Afrique orientale et méridionale. C'est avec l'entérite à virus, la maladie qui offre le plus d'analogies cliniques avec la peste.

Diagnostic épizootologique. — Il est extrêmement rare de voir le coryza gangréneux évoluer par foyers ou sous forme de petites épizooties. On ne rapporte ordinairement que des cas isolés, à tel point que l'on a pu dire de cette maladie qu'elle était infectieuse et non contagieuse. Si la morbidité est basse, la mortalité est par contre très élevée, dépassant 90 p. 100.

Le coryza gangréneux se rencontre avec plus de fréquence là où le bétail est mélangé aux moutons ; la maladie inapparente du gnou a été décrite.

Diagnostic clinique. — En Afrique, le coryza gangréneux évolue plus volontiers sous la forme *oculo-nasale*, sans complications digestives, ni nerveuses (planche 3).

Le début en est brutal et sidère l'animal, qui présente les signes des grandes septicémies ; l'hyperthermie est élevée (40° 5), *durable* tout au long de la maladie, ce qui est un premier signe distinctif de la peste. Apparaît une congestion très violente des muqueuses visibles de la tête : oculaire, nasale et buccale. Un jetage oculo-nasal s'établit, d'abord séreux puis muco-purulent. Le jetage oculaire s'épaissit vite, donnant des placards crustacés dans l'angle interne de l'œil tandis que se développe une kératite qui opacifie la cornée. Le jetage nasal devient de plus en plus abondant, filant, strié de sang et contenant des fausses membranes. Il adhère aux naseaux et au muffle dont il entraîne l'exfoliation superficielle. Une toux rare peut se faire entendre.

L'abattement est intense. La percussion des sinus est très douloureuse et la palpation des cornes entraîne des mouvements de défense. On peut assister à la chute de l'étui corné.

Des ulcères semblables à ceux vus dans la peste peuvent se rencontrer dans la bouche, sur les gencives et tout spécialement sur le plancher buccal.

PLANCHE 6.



Photo 17. — Rhinotrachéite bovine — Jelage.



Photo 19. — Coryza gangréneux — Ulcération en nappe du muffle.



Photo 16. — Rhinotrachéite bovine — Rhinite sialorrhée et larmolement.



Photo 18. — Coryza gangréneux — Ulcération du plancher buccal.

Photo 16 : extraite de *Am. J. vet. Res.* 1957, 18 (67) : 246-56.

Photo 17 : extraite de *Dtsch. tierärztzt. Wochr.*

Photos 18 et 19 : extraites de *J. am. vet. med. Ass.* 1958, 132 (6) : 243-8.

Les ganglions lymphatiques grossissent énormément et sont visibles de loin, d'autant plus que l'amaigrissement est intense bien que l'appétit se conserve longtemps.

La mort est la terminaison quasi inéluctable. *Il n'y a pratiquement jamais de diarrhée.* La maladie dure de dix à douze jours.

La diarrhée existe dans la *forme intestinale* où les symptômes naso-oculaires sont plus discrets. Le diagnostic clinique différentiel de cette forme avec celui de la peste bovine est pratiquement impossible à faire ; il repose uniquement sur l'absence de contagiosité.

En pratique, le diagnostic clinique du coryza gangréneux est basé sur l'abondance et la ténacité du jetage oculo-nasal, sur la kératite (qui n'existe dans la peste que lorsque cette dernière se complique de trypanosomiase), sur l'hypertrophie ganglionnaire.

Diagnostic nécropsique. — La maladie peut là encore en imposer pour de la peste.

On retrouve une congestion généralisée de toutes les muqueuses de la tête. Les cavités nasales sont remplies de dépôts caséux qui recouvrent des érosions muqueuses. Il en est de même dans les sinus frontaux, le pharynx, la trachée. Toutefois, contrastant avec ces atteintes, le poumon est macroscopiquement normal.

Sur la muqueuse de la caillette, on note de petites hémorragies ainsi que de petits ulcères cratéri-formes à centre noir.

Le reste du tube digestif est normal, en particulier n'existent pas les lésions de la valvule iléo-cœcale, ni la rectite hémorragique de la peste.

La surface de section des ganglions lymphatiques est rougeâtre. Des granulations blanchâtres se rencontrent dans le foie et les reins et dans ces derniers organes, on note une hypertrophie des corpuscules de Malpighi qui donnent une apparence granuleuse à la coupe.

Le cerveau paraît « cuit » et a une odeur de bouillon.

Diagnostic expérimental. — L'inoculation intraveineuse d'une grande quantité de sang (au moins 300 ml) à un veau reproduit la maladie. On peut également inoculer un lapin.

Sur le cadavre, prélever des fragments de foie, de rein et de cerveau que l'on place dans le fixateur pour examen histologique (infiltration périvasculaire).

3. — FIÈVRE DES TRANSPORTS

Cette maladie n'est pas connue jusqu'à maintenant en Afrique centrale et occidentale. Essentiellement respiratoire (rhinite et bronchopneumonie), elle ne saurait être confondue avec la peste.

E. — AFFECTIONS TOUCHANT LA MUQUEUSE DE LA CAILLETTE

Nous citerons pour mémoire :

— L'helminthiase à *Haemonchus contortus* lorsque l'infestation est réellement massive,

— Les traitements anthelminthiques par des produits irritants et en particulier par des phénothiazines impures,

— la Théilériose à *Theileria parva* ou *East Coast Fever*, celle à *Theileria lawrenci* ou *Corridor disease*. Ces deux protozooses n'existent pas en Afrique centrale et occidentale. Dans les régions infectées, elles peuvent être confondues cliniquement avec une peste bénigne : fièvre, larmolement, salivation, diarrhée. Mais l'atteinte du poumon par œdème pulmonaire est constante dans la théilériose, et l'animal réagit fortement aux excitations contrairement à ce que l'on voit dans la peste. A l'autopsie, on note des suffusions sanguines tout au long du tube digestif, mais elles existent également ailleurs : rein, graisse pélvienne. Des ulcères sont présents dans la caillette. Le poumon est invariablement touché et contient un liquide séreux.

— La trypanosomiase aiguë, et tout spécialement celle à *Trypanosoma vivax*, montre à l'autopsie des hémorragies des plis de la caillette et dans le duodénum ; on les retrouve aussi dans les muscles

abdominaux, la graisse péri-rénale, sur toutes les séreuses, sur les oreillettes et la crosse aortique. Un épanchement péricardique est fréquent. Il n'y a pas d'ulcères buccaux, ni de rectite.

F. — AFFECTIONS TOUCHANT LA MUQUEUSE INTESTINALE

Il n'y aurait aucune difficulté à éliminer cliniquement l'*entérite paratuberculeuse* (maladie de Johne). Les cas en sont très rares en Afrique centrale ou occidentale. Est-ce réellement une maladie peu répandue ou non diagnostiquée ?

La *coccidiose bovine* se présente comme une diarrhée aiguë, striée de sang, rapidement débilitante. Mais il n'y a jamais de fièvre, ni d'ulcères buccaux.

Elle peut être associée à la peste dont elle est un facteur aggravant. La présence de kystes dans les fèces d'un bovin n'élimine pas la peste.

La *bilharziose intestinale* est asymptomatique chez le zébu ; ce n'est qu'une trouvaille d'autopsie.

3^e PARTIE**DIAGNOSTIC EXPÉRIMENTAL DE LA PESTE BOVINE**

Le recours au diagnostic expérimental s'impose de nos jours aussi bien en pays neuf qu'en pays infecté :

— En pays neuf, parce que la suspicion épizootologique, clinique ou nécropsique de peste bovine pose des impératifs sanitaires si graves que le laboratoire se doit d'apporter une certitude. Sa rapidité d'intervention devrait éviter que ne se reproduisent les incidents de 1920 en Belgique ou de 1949 en Italie.

— En pays d'enzootie, parce que prédominant maintenant des formes atypiques, que se fait jour une pathologie nouvelle qui n'est pas sans rappeler la peste, et que la contamination d'espèces irrégulièrement réceptives, dont singulièrement les chèvres, prend de plus en plus d'ampleur. Le succès des campagnes d'éradication actuellement menées, demande qu'un diagnostic exact soit posé ; c'est lui qui permettra de suivre ou de comprendre une épizootologie qui peut rester équivoque par sa seule expression clinique.

Le diagnostic expérimental de la peste bovine vise à mettre en évidence :

- dans les tissus ou humeurs d'un animal infecté, le virus bovine pestique (ou l'un de ses constituants),
- ou bien la trace sérologique de son passage,
- ou bien sa trace lésionnelle dans les tissus, par la recherche des lésions spécifiques de l'infection pestique.

Il est bien évident alors que les deux premières recherches peuvent être menées sur l'animal vivant ou sur le cadavre, la dernière ne sera qu'un complément de l'autopsie.

Les méthodes se basant sur la recherche de l'allergie n'ont pas encore fait la preuve de leur valeur.

I. — DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE

Le diagnostic histologique ne peut être mené qu'à partir des prélèvements effectués sur un cadavre.

Il est basé sur la reconnaissance, dans les épithéliums et tissus touchés par le virus, de cellules multinucléées (plasmodes ou syncytiums) et d'inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires. Cette trilogie lésionnelle, à l'exclusion de toute autre, a seule valeur de certitude.

Elle se rencontre dans :

- l'assise génératrice (corps muqueux de Malpighi) des épithéliums pavimenteux stratifiés : cavité bucco-pharyngienne, amygdale, muqueuse vulvaire et du fourreau, conjonctive palpébrale, orifice nasal.
- les tissus lymphoïdes : ganglions lymphatiques, follicules lymphoïdes des plaques de Peyer de l'intestin, où leur reconnaissance peut être obscurcie par les lésions de dégénérescence concomitantes.

Les prélèvements seront effectués et envoyés au laboratoire spécialisé ainsi qu'il est exposé dans la fiche technique n° 2.

En tout état de cause, le diagnostic histologique de la peste bovine demande une très grande technicité, et seuls quelques laboratoires sont susceptibles de faire cette recherche *.

* En Afrique francophone, envoyer les prélèvements au Laboratoire de recherches vétérinaires de Farcha Fort-Lamy, Tchad, ou à celui de Hann, Dakar, Sénégal.

PLANCHE 7.



Photo 20. — Peste bovine — Plasmodes dans une coupe de muqueuse gingivale (G : 110).



Photo 21. — Peste bovine — les mêmes à plus fort grossissement (G : 800).

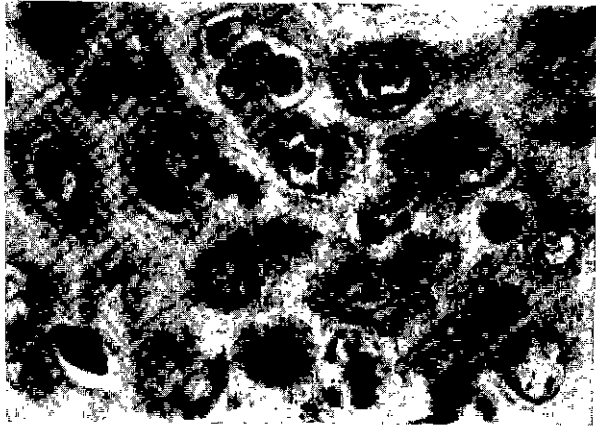


Photo 22. — Rhinotrachéite bovine — Inclusions intranucléaires dans un frottis de muqueuse nasale (G : 800).

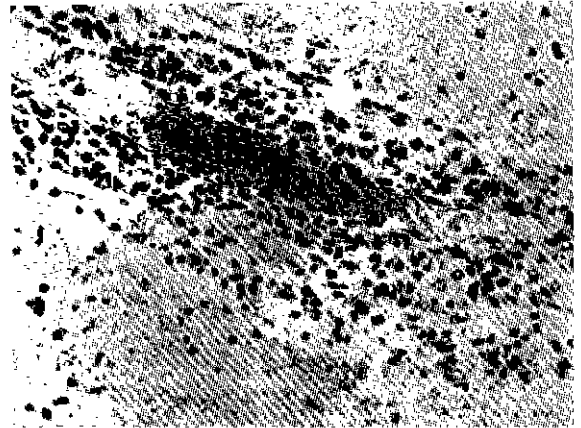


Photo 23. — Coryza gangréneux — Infiltration mononucléaire périvasculaire dans le cortex cérébral (G : 110).



Photo 24. — Peste bovine — Plasmode multinucléée en culture cellulaire de rein d'embryon de veau (G. 320).

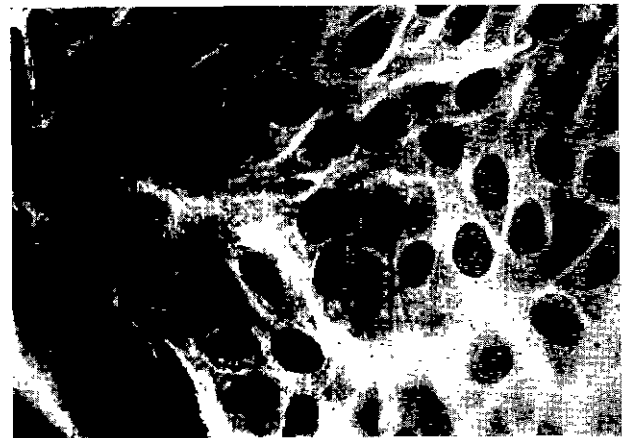


Photo 25. — Culture témoin non infectée (G : 320).

Photo 22 ; extraite de *Dtsch. tierärztl. Wschr.*

Photo 23 : extraite de *Am. J. Vet. Res.*, 1960, 21 (85) : 1015-27.

Après exécution des coupes, seront pratiquées les colorations à l'hématoxyline-éosine ou au trichrome de Masson, celles de Mann et d'Altmann.

Les plasmodes multinucléés seront recherchés sur les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine, en insistant sur celles provenant des prélèvements de muqueuses épithéliales ; les inclusions intracytoplasmiques et éventuellement intranucléaires sur celles des amygdales et des formations lymphatiques (planche 7).

Les coupes de muqueuse nasale colorées par l'hématoxyline-éosine permettront de poser le diagnostic histologique de rhinotrachéite infectieuse bovine par la reconnaissance d'inclusions intranucléaires du type A de Cowdry, tandis que les coupes de cerveau et de foie pourront faire pencher pour le coryza gangréneux si l'on y note des foyers d'infiltration périvasculaire que l'on rencontre dans cette maladie.

Une recherche négative ne peut en aucun cas éliminer le diagnostic de peste bovine. Il est en effet des souches de virus qui ne donnent que de très petits plasmodes épithéliaux. En d'autres cas, la maladie peut être trop avancée et les lésions spécifiques seront obscurcies par les lésions de nécrose ou de remaniement. En conséquence, devront toujours être tentées à partir du cadavre les autres méthodes expérimentales du diagnostic qui sont l'isolement du virus ou son identification par les techniques de fixation du complément ou de précipitation-diffusion en gélose.

II. — DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Il se base soit sur la reproduction de la maladie clinique chez un hôte sensible, soit sur l'isolement et l'identification du virus en cultures cellulaires.

A. Reproduction de la maladie

C'est la plus ancienne des méthodes de diagnostic expérimental de la peste bovine. C'est elle que l'on employait en Afrique pour s'assurer du diagnostic. C'est pourtant elle qui peut être la plus sujette à caution de nos jours par suite de la difficulté de trouver des animaux à coup sûr sensibles, et de l'existence de souches de virus naturellement atténuées ne donnant qu'une symptomatologie frusie.

En pays neuf, où l'approvisionnement en bovins sensibles ne fait pas défaut, elle est entravée par la crainte de provoquer un foyer nouveau à partir de l'animal inoculé ; on n'y aura donc recours que si l'on a à sa disposition des étables d'isolement spécialement conçues pour l'étude des virus. Il ne peut qu'être déconseillé d'y faire appel dans le cas contraire.

Choix des bovins. Il ne se pose pas en pays neuf.

En région d'endémicité soumise à une prophylaxie intensive, deux alternatives s'offrent à l'expérimentateur : importer et constituer un stock de bouvillons sensibles venant d'un pays neuf ; ou bien acheter des veaux âgés de dix mois environ, ne portant aucune marque distinctive de vaccination, et les saigner en vue de la recherche d'éventuels anticorps neutralisants (voir fiche technique n° 4) ; on ne retiendra que ceux qui en sont dépourvus.

Il serait particulièrement déconseillé d'effectuer un diagnostic de peste par inoculation si l'on n'était pas tout à fait sûr de la réceptivité des animaux ; c'est, à notre avis, la plus lourde hypothèque qui pèse sur la méthode.

Quatre veaux sont nécessaires. Deux seront inoculés avec le matériel infecté, deux autres auront été inoculés au moins quinze jours auparavant avec l'un des vaccins antipestiques actuellement existants (à l'exclusion d'un vaccin inactivé qui demande un trop long temps pour que s'établisse l'immunité, brève d'ailleurs dans sa durée).

Prélèvements. On prélève

a) sur un animal abattu ou un cadavre frais, les ganglions lymphatiques (en excluant les ganglions mésentériques, souvent fortement contaminés par des germes de souillure) ;

b) sur un animal malade, du sang citraté, hépariné ou additionné de versène (voir fiche technique n° 3).

Les prélèvements sont placés dans des récipients étanches ; toutes indications utiles y sont portées ; une fiche de renseignements est remplie (fiche technique n° 1).

Si l'on a à convoier ou expédier les prélèvements, les envoyer sous froid, en boîte isotherme avec une quantité suffisante de glace. Les prélèvements de ganglions lymphatiques peuvent être congelés, mais le sang ne devra jamais l'être sous peine de destruction rapide du virus ; il sera conservé et envoyé dans la glace fondante.

Inoculation. On décapsule les ganglions et on les découpe (une partie aliquote est conservée pour effectuer une précipitation-diffusion en gélose)* ; on les broie (mortier, pilon et sable ou mixer) dans environ 10 fois leur poids de sérum physiologique glacé ; on a intérêt à ajouter 1.000 unités de pénicilline et 1.000 µg de streptomycine par millilitres. Après centrifugation, on inocule 10 millilitres de surnageant par voie sous-cutanée aux quatre veaux (deux réceptifs, deux immuns). Le sang sera inoculé directement par voie sous-cutanée.

Observation. Les veaux inoculés sont placés dans les box d'isolement. Un personnel spécial s'occupera de les affourager, et toutes précautions seront prises pour éviter les « fuites » de virus.¹ Les températures seront relevées chaque matin. Toute élévation thermique entraînera un examen clinique détaillé et la confection d'un frottis de sang pour la recherche d'éventuels hémoparasites.

Si le virus bovipestique est présent dans les prélèvements, la maladie apparaît chez les seuls veaux non vaccinés dans un délai de trois à douze jours.

La constatation d'une fièvre diphasique accompagnée ou non de diarrhée et d'ulcérations buccales doit faire suspecter une diarrhée à virus. Il est alors possible que les veaux immunisés par le vaccin la présentent aussi. On devra tenir dans ce cas la même conduite que celle dont nous parlerons maintenant.

S'il n'existe que des signes équivoques (diarrhée sans lésions buccales, larmolement sans diarrhée, diarrhée sans hyperthermie...), on devra pratiquer la recherche de l'antigène pestique par ponction-biopsie d'un ganglion d'un veau inoculé (voir fiche technique n° 6, 4^e temps) et effectuer, soit une déviation du complément (fiche technique n° 5), soit une réaction de précipitation-diffusion en gélose (fiche technique n° 6). Dans le cas où les signes cliniques de peste bovine ne s'affermissent pas, sacrifier l'un des veaux et effectuer les deux recherches précitées sur ses ganglions lymphatiques. L'autre sera saigné quinze jours après et sur son sérum sera effectuée la recherche des anticorps antipestiques (*vide infra* : Diagnostic sérologique, et fiche technique n° 6).

C'est dire que de sérieuses limitations sont maintenant imposées à une technique simple qui connut autrefois la faveur des expérimentateurs. C'est dire aussi que le diagnostic de peste mené dans ces conditions et faisant appel à une technicité poussée relève de laboratoires bien équipés ;

Variante du procédé. Au lieu d'inoculer des veaux sensibles, on peut avec avantage inoculer des chèvres. Etant donné la réceptivité variable de cette espèce selon les races et les individus, eu égard également aux mortalités non spécifiques qui arrivent lorsqu'on garde des chèvres en stabulation, c'est douze animaux que l'on devra sélectionner en vue du diagnostic ; ils seront saignés et leurs sérums conservés pour être examinés plus tard.

Les conditions et le traitement du prélèvement seront les mêmes. Deux chèvres seront inoculées avec un virus-vaccin capripes-tique pour avoir une idée de la réceptivité à la peste du lot de chèvres achetées : une au moins devrait réagir. La peste d'origine bovine étant bien souvent asymptomatique chez les chèvres, la clinique renseignera dans bien peu de cas, mais la recherche de l'antigène pestique ou des anticorps antipestiques tranchera la question : ces deux recherches seront menées dans les mêmes conditions que celles que nous avons évoquées pour le veau.

Cette variante n'a été encore qu'assez peu expérimentée. Elle a l'avantage de pouvoir être à la portée des stations décentralisées ; la technique employant l'inoculation à la chèvre suivie de la recherche de l'antigène pestique chez cet animal semblerait particulièrement recommandable.

* On peut se demander à quoi sert d'effectuer une recherche virologique longue et coûteuse alors que la précipitation en gélose est simple et économique ; c'est qu'il peut exister une dissociation ainsi que nous l'exposerons plus loin.

B. Isolement et identification du virus en cultures cellulaires

C'est à notre sens le procédé de choix.

Avantages : — à faible prix de revient par rapport à l'inoculation au veau sensible ;

— commodité de la manipulation ; suppression des box d'isolement et des précautions pour l'affouragement ;

— pas de risques d'infections intercurrentes, notamment de fièvre aphteuse qui aurait pu être cliniquement confondue avec la peste lors des prélèvements ;

— sécurité de la réponse, corollaire de l'utilisation de cellules à réceptivité totale, contrastant avec la sensibilité douteuse des veaux en région d'endémicité ;

— sensibilité, pour le diagnostic tout au moins, égale à celle du veau.

Inconvénients : — Technique réservée à un laboratoire très bien outillé ; cet argument tombe d'ailleurs si l'on se rappelle les objections que nous avons mises en avant quant à l'approvisionnement en veaux sensibles, la réceptivité des animaux devant être mise en évidence par une séro-neutralisation.

Prélèvements. Ils seront effectués selon les indications portées sur la fiche technique n° 3.

Les ganglions seront de préférence prélevés sur un animal abattu, plutôt que sur un cadavre mort naturellement. Si l'on ne peut disposer que de cadavres, prélever ceux de la tête (parotidien, sous-maxillaires, rétropharyngien). Les instruments devront avoir été désinfectés (ébullition prolongée, au minimum) ; on se servira d'instruments différents pour inciser la peau et pour détacher les ganglions des fascia conjonctifs.

Placer les ganglions dans des récipients stériles (ou maintenus pendant 20 minutes au moins dans l'eau bouillante, puis refroidis après avoir été fermés). N'ajouter aucun antiseptique. Réfrigérer immédiatement dans la glace. Envoyer au laboratoire, accompagner d'une fiche de renseignements, sans rupture de froid et dans les meilleurs délais.

Les ganglions peuvent être congelés.

Le sang sera prélevé sur un animal vivant, cliniquement suspect, on se conformera aux indications de la fiche technique n° 3. Ne jamais congeler le sang ; l'expédier dans la glace fondante.

Après broyage des ganglions au 1/10 en tampon P. B. S. additionné d'antibiotiques, le laboratoire procédera à un cycle de gel-dégel sur le broyat, suivi d'une centrifugation. Une partie aliquote sera de nouveau diluée au 1/10 en liquide de Hanks. Cette dilution servira à infecter :

1° des cellules de rein d'embryon de veau fraîchement préparées (1 partie de broyat pour 9 parties de cellules dans le milieu de croissance contenant 10 p. 100 de sérum de veaux réceptifs à la peste). Après séjour d'une heure à 37° pendant laquelle sont faites de fréquentes agitations, la suspension cellulaire est répartie en tubes cylindriques ou mieux en tubes de Leighton contenant des lamelles,

2° des cellules identiquement préparées mais mises en suspension dans le milieu de croissance contenant 10 p. 100 de sérum d'un veau immun de peste bovine. Le traitement ultérieur est le même.

Après renouvellement du milieu de culture au bout de deux jours, suivi de renouvellements tous les deux jours, les tubes seront observés à partir du 4^e jour après l'inoculation, puis tous les jours pendant dix jours. Le diagnostic peut être porté dès le 4^e jour lorsqu'apparaîtront dans les tubes inoculés et ayant reçu le sérum normal les effets cytopathiques (plasmodes multinucléés), qui seront absents dans les tubes ayant reçu le sérum immun (planche 4).

Le sang arrivant au laboratoire sera centrifugé, la fraction leucocytaire récoltée, lavée et mise en culture dans les mêmes conditions que les ganglions.

La valeur du diagnostic ainsi porté sera fonction de la correction avec laquelle ont été faits les prélèvements et de leur fraîcheur, de la rapidité de leur transmission. L'un des grands avantages de la culture cellulaire est qu'elle est apte à détecter les souches hypo-virulentes qui pourraient ne donner par inoculation au veau, que des symptômes frustes ou équivoques.

III. — DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

Rappels préliminaires : on définit par *antigène* toute substance étrangère à un organisme qui, introduite par voie parentérale dans cet organisme, y détermine la formation d'anticorps.

On définit par *anticorps* des globulines sériques qui apparaissent dans un organisme quand s'y trouve introduite une substance étrangère dite antigène.

En principe, à chaque antigène correspond un anticorps qui lui est spécifique. Un antigène s'unit, se copule spécifiquement à l'anticorps correspondant lorsque tous deux viennent en contact ; ils forment alors ensemble un *immun-complexe*.

Par extension, le terme d'antigène est appliqué en sérologie aux substances que l'on introduit dans les réactions pour mettre en évidence les anticorps.

Le diagnostic sérologique de la peste bovine est basé sur deux recherches différentes :

- la recherche de l'antigène pestique dans le matériel suspect (ou chez le veau ou la chèvre sensibles inoculés de matériel suspect, ainsi qu'il a été dit au chapitre : Diagnostic virologique). Cette méthode est une méthode rapide, donnant à partir de prélèvements exécutés sur un cadavre, un animal abattu ou éventuellement un malade, sa réponse en quelques heures pourvu que l'on ait l'équipement et le matériel nécessaires,

- la recherche d'anticorps déviant le complément, inhibant la précipitation ou neutralisant dans le sérum d'animaux convalescents d'une maladie que l'on soupçonne avoir été la peste (ou inoculés avec un matériel suspect ainsi qu'il est décrit au chapitre : Diagnostic sérologique). Cette recherche, par les délais qu'elle demande (temps entre la constatation de la maladie et les prélèvements de sérum) n'offre guère qu'un intérêt spéculatif quant au diagnostic et ne peut être conseillée que pour des études épizootologiques *a posteriori*.

A. Recherche de l'antigène pestique

Alors que, dans le diagnostic virologique, on cherchait à isoler le virus virulent, l'antigène que l'on met en évidence ici n'est pas la particule virale infectieuse mais l'antigène « soluble » qui l'accompagne*.

Deux groupes de méthodes retiennent l'attention ; ce sont la déviation du complément et la précipitation-diffusion en gélose. Toutes deux mettent en jeu le même « antigène soluble » viral et le même anticorps sérique ; seules changent les modalités techniques pour la mise en évidence de la formation (ou de son absence) de l'immun-complexe formé par l'union de l'antigène et de l'anticorps.

Dans la réaction de précipitation-diffusion en gélose, on donne à l'antigène soluble le nom de précipitogène ; ce terme ne désigne pas un antigène particulier et n'est utilisé que par commodité.

Principes : Les deux réactions de précipitation en gélose et de déviation du complément sont basées toutes deux sur le même phénomène : la formation de l'immun-complexe entre l'antigène pestique soluble et son anticorps. Dans le cas qui nous occupe (diagnostic de la peste bovine par recherche de l'antigène pestique), l'anticorps est connu : c'est un immun-sérum de référence ; l'antigène mis sous test est l'inconnu.

Précipitation-diffusion en gélose : Dans un gel de gélose contenu dans une boîte de Pétri, on creuse deux puits de quelques millimètre de diamètre, distants l'un de l'autre de quelques millimètres. L'un est rempli de l'immun-sérum antipestique de référence, l'autre d'un broyat de ganglion pestique. Les molécules de l'immun-sérum et de l'antigène diffusent dans la gélose tout autour de leurs deux réservoirs ; là où elles se rencontrent se forme l'immun-complexe ; les molécules d'immun-complexe formées s'accrochent les unes aux autres et étant présentes en grande quantité dans le gel, deviennent visibles et forment la bande de précipitation.

* Lors de la multiplication d'un virus, dans les cellules sensibles s'élaborent dans le cytoplasme et diffusent hors de la cellule en même temps que le virus des « antigènes solubles » qui ne sont pas par eux-mêmes d'essence virale, mais plutôt des témoins (*by-products*) de l'infection cellulaire par le virus

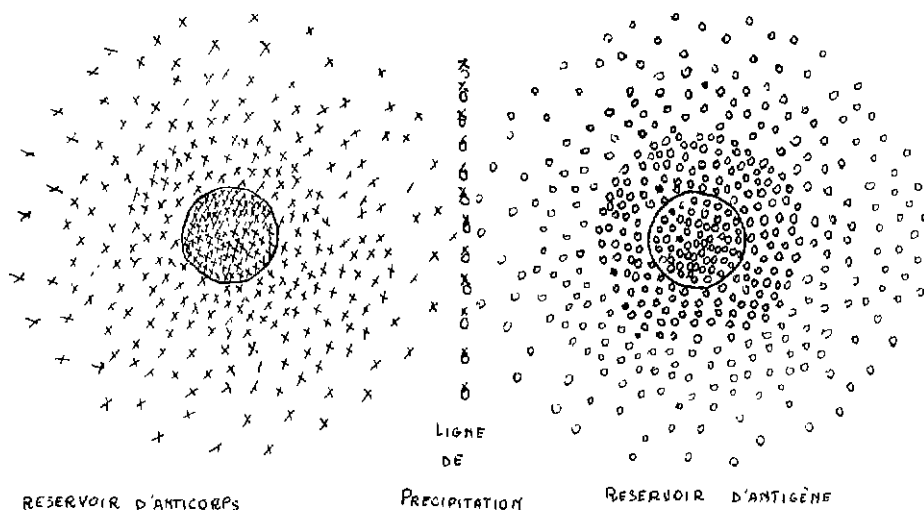


Fig. 1. — Précipitation — diffusion en gélose.

Déviatiôn du complément. — Dans cette réaction, qui se fait en tubes, les deux réactifs sont très dilués ; ayant lieu en milieu liquide, les molécules d'immun-complexe formées ne sont pas visibles. Pour les objectiver, on emploie un artifice de laboratoire qui est basé sur le fait que les molécules d'immun-complexe formées adsorbent le complément (ou alexine contenue dans le sérum frais) de cobaye que l'on introduit dans la réaction. Ce complément étant adsorbé sur l'immun-complexe, ne sera plus libre pour assurer la lyse d'hématies de mouton que l'on introduit ultérieurement dans les tubes sous forme de complexe lytique hématies de mouton-sérum hémolytique anti-mouton.

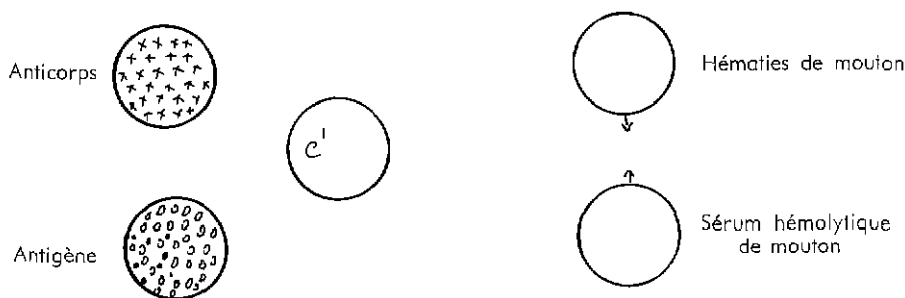


Fig. 2. — Schéma de la réaction de déviation du complément.

Dans le cas de réaction positive, il y a formation de l'immun-complexe (antigène pestique soluble + immun-sérum antipestique) qui adsorbe le complément. Celui-ci n'est plus libre et il n'y a donc pas lyse des hématies de mouton ; le tube contenant les réactifs reste trouble par suite de la présence d'hématies de mouton intactes.

Dans le cas de réaction négative, il n'y a pas formation de l'immun-complexe (immun-sérum anti-pestique + quelque chose d'autre qui n'est pas un antigène pestique). Le complément reste libre et assure la lyse des hématies de mouton ; le tube contenant les réactifs sera clair et contiendra une solution d'hémoglobine venant des hématies lysées.

Réalisation. Tous les détails sont donnés dans la fiche technique n° 5 pour la déviation du complément et la fiche technique n° 6 pour la précipitation-diffusion en gélose.

On se rendra aisément compte que les méthodes de déviation du complément, par la technicité qu'elles requièrent, ne sont recommandées qu'aux laboratoires et aux personnes possédant une pratique des manipulations de sérologie. Parmi elles, notre préférence va à la technique de Cowan, dont l'antigène est facile à préparer (cet antigène pourrait d'ailleurs servir pour la précipitation-diffusion en gélose) et la sensibilité très correcte pourvu que la fixation se fasse pendant dix-huit heures à $+4^{\circ}\text{C}$ et non deux heures à 37° .

Par contre, la précipitation-diffusion en gélose, simple à mettre en œuvre, ne demande qu'un minimum de moyens. *C'est une technique qui peut être mise entre les mains des vétérinaires de brousse.* Bien qu'étant environ 100 fois moins sensible que la réaction de déviation du complément pour détecter l'antigène pestique, elle l'est tout de même suffisamment dans la pratique pour pouvoir rendre service et mérite d'être diffusée. C'est donc à elle principalement que s'adresseront les quelques commentaires qui suivent.

Spécificité. Les deux réactions sont spécifiques. SCOTT et BROWN (1961) confirment que sur 693 prélèvements provenant de 18 espèces, ils n'eurent aucune fausse réaction positive en précipitation-diffusion.

Sensibilité. Elle est sous la dépendance de plusieurs facteurs :

1. La date de la récolte des ganglions après le début de la maladie. Des titrages d'antigène obtenus au cours de la peste expérimentale ont montré que son développement était maximal au 6^e jour de la maladie. Si l'on collecte les ganglions servant à préparer l'antigène au premier jour de la maladie

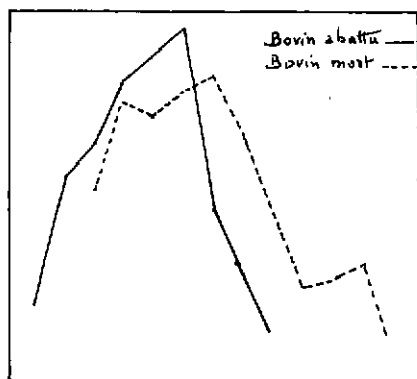


Fig. 3. — Evolution du précipitogène avec l'infection pestique.

En ordonnée : log 0-2

En abscisse : jours après le début de la fièvre

(d'après SCOTT et BROWN)

(début de l'hyperthermie), on pourra poser un diagnostic négatif en précipitation-diffusion en gélose, alors que la déviation du complément et la recherche du virus seront toutes deux positives. La période optimale se situe dans les premiers jours de la maladie, avant même que n'apparaisse la diarrhée.

Les animaux pestiques qui ont une diarrhée persistant depuis plusieurs jours et qui sont déshydratés fourniront très probablement une réponse négative.

2. L'intensité de la maladie clinique. La précocité d'apparition des lignes de précipitation ainsi que leur netteté, est fonction de la gravité de la peste chez le bovin donneur de ganglions ; c'est dire que la sensibilité de la réaction est directement fonction de la virulence de la souche pestique en cause. Cette opinion, déjà émise par SCOTT et BROWN (1961), a été confirmée par nous-mêmes. Il est difficile, avec les souches peu virulentes donnant une peste atypique ou asymptomatique, d'avoir des lignes de précipitation nettement visibles. En présence de tels cas et si l'on soupçonne vraiment la peste, la sagesse demande que l'on envoie au laboratoire spécialisé des prélèvements de ganglion lymphatique et de sang pour la recherche du virus en cultures cellulaires.

3. La thermo-instabilité du précipitogène. SCOTT et BROWN (1961) ont précisé les limites d'activité de l'antigène (précipitogène) conservé à différentes températures :

Température (°C)	Limites d'utilisation	
— 20	> 1 an	
10	> 96 heures	< 117 heures
20	> 24 —	< 48 —
30	> 6 —	< 8 —
40	> 11 minutes	< 20 minutes
50	> 3 —	< 6 —

De là découlent deux impératifs :

a) la nécessité de préparer le broyat de ganglions devant servir à la réaction dans les quelques minutes suivant le prélèvement. Si l'on doit attendre quelque peu, conserver le ganglion dans un récipient étanche immergé dans la glace fondante. Lorsque le broyat est fait, exécuter immédiatement la réaction ou bien conserver ce broyat dans la glace fondante.

b) l'obligation de tenir compte de la température ambiante pour l'incubation des boîtes de gélose, une fois disposés les éléments de la réaction. Nous avons vu dans le tableau précédent qu'à 40 °C, température qu'il est assez fréquent de rencontrer en Afrique centrale, il est inactivé en moins de 20 minutes. Si l'on opère dans des conditions météorologiques dures, il est nécessaire sous peine de nullité de la réaction :

- de conserver les réactifs, notamment l'antigène de référence et l'antigène suspect sous froid (freezer, réfrigérateur ou glace fondante),
- de réfrigérer (sans les congeler, ce qui les rendrait inutilisables) les gels de gélose coulés en boîtes de Pétri, avant d'effectuer la réaction,
- lorsque les réactifs sont répartis, de placer les boîtes dans un réfrigérateur ou un récipient isotherme contenant de la glace fondante. La réaction sera alors retardée de 24 à 36 heures, mais on ne courra pas le risque d'avoir un test rendu négatif par thermo-inactivation de l'antigène.

Malgré les limites que nous venons de lui imposer, le diagnostic de la peste bovine par la méthode de précipitation en gélose reste très valable, tout spécialement si l'on envisage plusieurs malades d'un même troupeau plutôt qu'un individu isolé. On peut attendre de la méthode 70 p. 100 de résultats positifs. La déviation du complément, plus sensible mais plus délicate, donnera des résultats positifs avoisinant 100 p. 100.

B. Recherche des anticorps antipestiques

Ainsi que nous l'avons déjà dit, cette recherche n'offre que l'intérêt du diagnostic *a posteriori*. Elle peut venir en complément des techniques d'identification virologique lorsque l'animal inoculé n'est pas mort (voir plus haut : Diagnostic virologique).

Il est indiqué d'y faire appel lorsque, sur une population bovine neuve, l'on pense avoir à faire à un virus de virulence amoindrie ; ce ne sera cependant qu'un complément de l'isolement du virus en cultures cellulaires.

Principe : Les infections virales déterminent, dans la grande majorité des cas, une apparition d'anticorps neutralisant le virus et déviant le complément avec l'antigène viral. Pour ce qui est de la peste bovine, les anticorps neutralisant persistent un temps très long après la guérison (13 ans au moins après inoculation de virus capripéste) alors que les anticorps déviant le complément sont plus fugaces (quelques jours à quelques mois après la guérison). C'est la raison pour laquelle, en pratique, on recherche surtout les anticorps neutralisant le virus *.

* WHITE et SCOTT (1960) ont proposé une méthode de détection des anticorps chez les bovins convalescents par inhibition de la précipitation en gélose ; on peut faire à cette technique le même reproche qu'à la déviation du complément : l'instabilité de ces anticorps *in vivo*. Pour cette raison, elle n'a pas connu le succès qu'elle était en droit d'attendre de par sa simplicité.

Pour ce faire, on met en présence sérum sous test (ou ses dilutions) et virus adapté à un système de culture choisi (bœuf, lapin, œuf, cultures cellulaires) puis l'on apprécie sur ce système l'absence ou la présence de virus, selon que le sérum aura ou n'aura pas d'anticorps neutralisants (voir fiche technique n° 4).

Cette recherche n'a de valeur que si l'on peut titrer dans un examen comparatif la teneur en anticorps de deux échantillons du sérum du bovin :

- l'un prélevé avant la maladie ou à la phase aigüe,
- l'autre prélevé trois semaines plus tard.

Ne faire de recherche que dans ce dernier prélèvement ne servirait à rien, car on ne pourrait à coup sûr rapporter à la peste (à moins que ce ne soit en pays neuf) la maladie qu'a présentée le bovin suspect.

Conditions du prélèvement : Les prélèvements de sang doivent être réalisés avec le maximum de propreté, sinon d'asepsie, possible. On se conformera aux indications données par la fiche technique n° 7. *Ne jamais ajouter d'antiseptiques aux prélèvements.*

Réalisation : On a le choix entre plusieurs méthodes : celle qui emploie le lapin et le virus lapinisé, celle qui emploie l'œuf et le virus avianisé, celle enfin qui utilise les cultures cellulaires. Seules les premières et dernières méthodes ont retenu la faveur des expérimentateurs car les souches avianisées sont parfois difficiles à propager et leur emploi pour la séro-neutralisation reste aléatoire.

Les méthodes de séro-neutralisation sur lapin (SCOTT et BROWN ; HUARD et ANDRÉ) sont relativement aisées à réaliser. Elles sont décrites en détail dans la fiche technique n° 4. La recherche des anticorps en cultures cellulaires a toutefois notre préférence parce que la moins coûteuse et la plus propre à la standardisation.

Résultats : La réponse est spécifique (pourvu que l'on ait pu comparer deux prélèvements d'un même sérum) et d'une bonne sensibilité. Elle exige malheureusement des délais incompatibles avec les nécessités d'une action sanitaire rapide.

4^e PARTIE**LA CONDUITE DU DIAGNOSTIC : CHOIX D'UNE MÉTHODE**

Au terme de cette revue des moyens du diagnostic de la peste bovine, nous devons en apprécier la valeur respective.

1. En pays normalement indemne, si la peste bovine éclate accidentellement (en dehors de la zone d'enzootie ou enclave d'élevage fermée en zone d'enzootie), les bases et les moyens du diagnostic seront :

- l'épizootologie : affection envahissante, très contagieuse, à morbidité et mortalité élevées,
- les signes cliniques sur lesquels nous n'insisterons pas,
- les lésions relevées à l'autopsie qui entraîneront la certitude pour peu que l'observateur soit averti.

Le diagnostic expérimental, par les réactions de déviation du complément ou de précipitation-diffusion en gélose, apportera en quelques heures la confirmation de la suspicion.

Intangible pour ce qui est des souches pleinement virulentes, cette conduite du diagnostic doit également tenir compte des souches atténuées dont la pluralité se fait jour, et qui pourraient infecter un bétail sensible. Nous avons déjà dit qu'elles se caractérisaient par la fugacité des lésions buccales qu'elles déterminaient, l'absence de diarrhée et la très faible létalité. Aucun incident de ce genre ne s'est encore manifesté, mais s'il se produisait, ne serait-on pas tenté d'invoquer d'abord une entérite à virus avant que de penser à la peste ? En ces circonstances, et plutôt que de se fier au flair clinique du vétérinaire, s'impose le diagnostic expérimental.

Par ordre de *sensibilité décroissante*, on classera les différentes méthodes du diagnostic expérimental :

- démonstration des anticorps spécifiques dans des échantillons de sérum. Sera utilisée l'une des techniques de séro-neutralisation indiquées dans la fiche technique n° 4 ; la technique utilisant la séro-neutralisation en cultures cellulaires, réalisable intégralement *in vitro*, doit remporter les suffrages.
- isolement du virus et son identification à partir de prélèvements ganglionnaires ou de sang inoculés à des bovins à hyper-sensibilité connue : bétail des races Jersey ou Guernesey, bétail noir japonais, bétail N'Dama. Outre les difficultés de se procurer en tous lieux ces types de bétail, nous avons indiqué les limites de cette épreuve, et il reste qu'elle ne peut être pratiquée qu'en zone protégée contre le virus.
- isolement du virus en cultures cellulaires de rein d'embryon de veau, à partir d'un prélèvement de ganglion ou du sang circulant. Epreuve *in vitro*, de sensibilité certes moins grande que la précédente, mais tout aussi valable si l'on reste sur le plan qualitatif et si l'on ne fait pas intervenir le titrage du virus à partir des produits pathologiques. A elle va notre préférence, car réalisable maintenant à l'échelon de toute nation et ne faisant appel qu'à des manipulations *in vitro* ; l'identification du virus fait appel à un échantillon de sérum antipestique que tout laboratoire national se doit de posséder. Son utilisation est à recommander très vivement lorsqu'on suspecte une peste à virus atténué ; les lésions cytopathiques pathognomoniques sont du même ordre quelle que soit la virulence de la souche.
- démonstration de l'antigène pestique fixant le complément, laissant à l'expérimentateur le choix de techniques variées (fiche technique n° 5) mais qui imposent également à un laboratoire national d'avoir un sérum hyperimmun de référence.
- démonstration de l'antigène pestique soluble par la réaction de précipitation-diffusion en gélose. Réaction *in vitro* la moins sensible de toutes, elle leur est supérieure par la simplicité des manipulations

qu'elle requiert, et mérite donc à ce titre d'être diffusée. Une hypothèque pèse néanmoins sur elle : son inaptitude à détecter, dans de nombreux cas, les souches hypovirulentes ; si l'on voulait donc l'utiliser pour diagnostiquer de telles souches, c'est plus en sondage sur un troupeau malade qu'à la faveur d'épreuves individuelles qu'il faudrait lui accorder du crédit.

- découverte des lésions histologiques, technique délicate, infidèle parce que celles-ci peuvent être supplantées par des lésions de nécrose. Un doute plane quant à la possibilité de reconnaître ainsi les pestes à formes atténuées.

2. En région infectée, le comportement du vétérinaire sera le même, attitude qui tranche avec les recommandations classiques. C'est l'expérience des pestes atténuées qui nous incite à recommander cette manière de faire car, malgré leur sens clinique, les vétérinaires d'Afrique noire ne peuvent imposer en maintes circonstances le diagnostic de peste avec les seules données qu'ils recueillent. Pour eux, le recours au laboratoire, s'impose. Ils conformeront leur attitude et leur choix aux indications exposées plus haut *.

Ainsi peut-on espérer, par la collaboration intime du vétérinaire travaillant sur le terrain et de celui du laboratoire, se faire une opinion exacte sur toute maladie pestiforme et arriver, par la rapidité de l'intervention sanitaire ou médicale, à l'éradication de la peste du continent africain. L'œuvre, déjà commencée, doit s'amplifier dans les années à venir. Elle ne sera couronnée du succès qu'elle se doit d'avoir que si tous les problèmes qui existent sont un à un résolus ; le diagnostic exact des foyers pestiques en est un.

* à l'exception près qu'ils devront soumettre deux échantillons de sérums (l'un prélevé à la phase aiguë, l'autre pendant la convalescence) pour bénéficier d'un séro-diagnostic valable.

FICHE TECHNIQUE N° 1

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Prélèvements pour recherche de Virologie, Sérologie, Histopathologie.

— N° de référence :

— Nom, fonction et adresse de l'expéditeur :

— Date et lieu du prélèvement (distance d'un centre important, coordonnées géographiques...)

— Intervalle de temps entre le moment de la mort et celui du prélèvement :

— Espèce, sexe, âge de l'animal :

— Nature du prélèvement (s'il y en a plusieurs, détailler) :

— Recherche demandée :

— Examen clinique du malade :

— Examen clinique du troupeau :

— Résultat de l'autopsie :

— Maladie suspectée :

— Effectif du troupeau :

— Nombre de malades dans le troupeau à la date du prélèvement (Malades + morts) :

— Nombre de morts :

— Morbidité suivant l'âge :

— Mode et date d'expédition :

— Observations.

FICHE TECHNIQUE N° 2

PRÉLÈVEMENTS A FAIRE EN VUE D'UN DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE DE PESTE BOVINE

1. — Préparation des fixateurs.

— Fixateur de Duboscq-Brazil :

alcool à 80°	150 ml
formol à 40 p. 100	60 ml
acide acétique	15 ml
acide picrique	1 g

— Fixateur de Flemming :

acide chromique à 1 p. 100	15 volumes
acide osmique à 2 p. 100	3 volumes
acide acétique	1 volume

A défaut de pouvoir préparer l'un ou l'autre de ces fixateurs, se servir d'eau formolée à 12 p. 100.

2. — Répartir le fixateur dans des flacons propres, d'assez grande ouverture, à fermeture bien étanche. Le volume de fixateur doit être d'au moins 10 fois celui du prélèvement.

3. — Prélever sur le cadavre (soit un animal abattu, soit un animal mort naturellement, à condition que les prélèvements ne soient pas faits plus de 6 heures après la mort) ;

- un fragment d'épithélium gingival, buccal, lingual, nasal, vulvaire ou du fourreau ;
- un fragment d'amygdale ;
- des fragments de ganglions lymphatiques, avec une préférence pour ceux de la tête ; des fragments des plaques de Payer ;
- un fragment de foie ;
- un fragment de cerveau.

Les prélèvements auront 1/2 cm d'épaisseur, 2-3 cm de longueur, 1-2 cm de largeur. Les immerger totalement dans le fixateur. Ne pas mettre dans le flacon d'abord le prélèvement puis le fixateur, car le prélèvement adhérerait alors à la paroi et le fixateur ne pourrait pénétrer sur toutes les faces.

Chacun de ces prélèvements sera placé dans un flacon indépendant. Fermer hermétiquement. Etiqueter chaque flacon.

4. Remplir une fiche de renseignements (fiche technique n° 1), en double exemplaire. L'une accompagnera les prélèvements.

5. Emballer dans un emballage résistant à l'écrasement et au choc. Remplir l'emballage d'une matière absorbante (fibre de bois, sciure, son, coton...).

6. Envoyer dans les meilleurs délais et par les moyens les plus rapides au laboratoire spécialisé.

FICHE TECHNIQUE N° 3

MÉTHODOLOGIE DES PRÉLÈVEMENTS POUR DIAGNOSTIC DE LA PESTE BOVINE PAR CULTURE CELLULAIRE

I. Préparation de la solution de versène.

Le versène rendra le sang incoagulable ; il est supérieur à l'héparine. *Ne pas employer de citrate de sodium.*

Versène (ou E. D. T. A.).....	1,5 g
Sérum physiologique	100 ml

Répartir par 5 ml en flacons de 20 cc préalablement stérilisés au four. Boucher au coton. Autoclaver 30 minutes à 120 °C (2 kg de pression) ; autolaver en même temps des bouchons de caoutchouc pour fermer les flacons. Après refroidissement, boucher les flacons avec les bouchons.

Si l'on ne dispose pas d'autoclave, mettre au bain-marie bouillant pendant une heure, et répéter l'opération 3 jours de suite en conservant le liquide à température ordinaire dans l'intervalle des opérations.

La solution de versène stérilisée peut être conservée bouchée à température ordinaire.

2. Prélèvement. On prélève

- soit un ganglion lymphatique sur un cadavre,
- soit du sang sur versène, à partir d'un animal vivant.

Matériel : Couteau à autopsie, pinces à dents de souris, ciseaux, aiguilles 7-14/10, coton, alcool, teinture d'iode, sparadrap. Crayon à bille. Récipient hermétique stérilisé.

— sur le cadavre. Autant que possible, cadavre d'un animal fraîchement abattu, ou mort depuis peu de temps.

Prélever un ganglion de la tête avec toutes les précautions désirables de stérilité : autopsie par plans successifs, préhension du ganglion avec les pinces sans y toucher autrement. Placer dans un récipient stérilisé ou à défaut bouilli et pouvant fermer hermétiquement. Etiqueter et congeler si possible. Envoyer sous glace au laboratoire avec une fiche de renseignements.

— sur l'animal vivant. Couper les poils sur la gouttière jugulaire. Désinfecter à la teinture d'iode (ou tout autre antiseptique puissant). Se passer les mains à l'alcool. Piquer la veine avec l'aiguille en s'efforçant de n'en pas tenir l'embout. Recueillir le sang dans un flacon de versène (1 partie de versène, 2 de sang). Boucher. Capsuler avec du sparadrap. Etiqueter. Mettre sous froid *sans congeler*. Expédier sous froid au laboratoire.

FICHE TECHNIQUE N° 4

LA SÉRO-NEUTRALISATION

I. — Dans l'identification du virus bovipestique

1^{re} méthode. Séro-neutralisation employant uniquement des veaux réceptifs.

— *Principe* : Un sérum antipestique hyperimmun contre la peste bovine est mis en contact avec le virus suspect ; le mélange virus-sérum est inoculé à des veaux sensibles. Si le virus est celui de la peste bovine, il sera détruit par l'action neutralisante du sérum et les animaux n'extérioriseront aucun symptôme, tandis que d'autres veaux inoculés avec le même virus mélangé cette fois avec du sérum de bovin normal, contracteront la peste.

— *Sérum* : Dans une telle technique la qualité du sérum neutralisant utilisé est essentielle. On utilisera le sérum d'un animal convalescent de peste bovine ou encore celui d'un animal vacciné puis hyperimmunisé par quatre inoculations sous-cutanées hebdomadaires de fortes doses de virus (broyat de rates et de ganglions). FOURNIER et HUARD (1959) obtiendraient un sérum antipestique de titre convenable en faisant des injections répétées de virus bovipestique lapinisé à des bovins à partir de pulpe de ganglions mésentériques de lapins infectés.

Ce sérum devrait être titré mais le titrage, qui consisterait à déterminer par séro-neutralisation chez le boeuf le nombre de doses infectantes 50 p. 100 de virus bovipestique que neutralise une quantité déterminée de sérum, s'avère trop onéreux.

Dans cette technique on admettra qu'un sérum antipestique neutralise 1.000 à 10.000 DI_{50} par millilitre et que la rate de bovin infecté contient 10^4 à 10^5 doses infectantes par gramme.

Le jour de la récolte, on coupe les poils à l'emplacement choisi sur la jugulaire et on désinfecte avec un tampon de coton imbibé d'alcool iodé.

Le sang est récolté après pose d'un garrot à la base de l'encolure, à l'aide d'une aiguille de fort diamètre montée sur une seringue stérile de 20 cc. Il est rejeté dans un tube à essai stérile bouché au coton et marqué au numéro de l'animal.

Les tubes sont laissés debout à température ambiante pendant quatre heures. Puis le caillot est décollé des parois du tube le plus aseptiquement possible avec une mince tige métallique flambée. Le sérum exude. Les tubes sont encore laissés quatre heures à température ambiante puis vingt heures au réfrigérateur. En partant de 20 ml de sang on doit obtenir 10 ml de sérum. Le sérum est recueilli dans des flacons de type pénicilline stériles. Des antibiotiques, pénicilline et streptomycine, sont ajoutés au sérum à raison de 1.000 U. I. de pénicilline et 1 mg de streptomycine par ml.

— *Préparation du matériel suspect* : Matériel : ciseaux, mortier, pilon et sable ou broyeur de verre ou mixer, glace, centrifugeuse, pots à centrifuger.

On utilise la rate ou les ganglions lymphatiques, ces derniers ayant pu être prélevés par biopsie sur un malade.

Les tissus prélevés doivent être gardés dans de la glace jusqu'à leur utilisation.

Des suspensions à 1 pour 10 et 1 pour 100 (poids pour volume) sont préparées dans une solution saline isotonique ou en bouillon, par hachage avec des ciseaux et broyage avec du sable stérile (le broyeur de Ten Brock ou le mixer peuvent aussi être utilisés à condition d'éviter un échauffement

excessif). Le surnageant, après centrifugation légère ou même simple décantation, constitue l'inoculum. Des antibiotiques peuvent être ajoutés aux mêmes taux que précédemment.

Les préparations doivent être conservées au froid en attendant leur utilisation.

— *Technique de l'épreuve.* Nous avons déjà indiqué (cf : Diagnostic virologique) que le succès de cette technique était conditionné par la susceptibilité des veaux et les facilités d'isolement des animaux inoculés : les deux groupes ne doivent pas être en contact l'un avec l'autre, et tout sera mis en œuvre pour empêcher la transmission du contag.

A chaque volume des suspensions de matériel suspect, on ajoute un volume égal de sérum préparé contre la peste bovine préalablement chauffé à 56 °C pendant 30 minutes. Des mélanges analogues de matériel suspect et de sérum normal de bovin réceptif sont également préparés. Tous ces mélanges sont placés au bain-marie à 37 °C pendant 30 à 60 minutes, puis ils sont inoculés chacun à deux bovins différents à raison de 2 ml par voie sous-cutanée.

Le titre du virus (si virus de la peste il y a) contenu dans le matériel suspect baisse de 1 log. au cours de la phase de contact à 37 °C. En conséquence, 2 ml de mélange contenant au départ 10^8 à 10^4 DI_{50} pour la dilution de rate à 1/10 et 10^2 à 10^3 DI_{50} pour la dilution de 1/100, renferment respectivement 10^2 à 10^3 et 10 à 10^2 DI_{50} après le séjour au bain-marie. Le sérum antipestique neutralisant 1.000 à 10.000 DI_{50} de virus par ml, neutralise donc le virus contenu dans les mélanges inoculés.

De cette façon, si le virus de la peste bovine existe dans les prélèvements de rate, les animaux inoculés avec le mélange virus-sérum de bovin réceptif extérioriseront une peste tandis que les animaux inoculés avec les mélanges virus-sérum immuns resteront indemnes.

2^e méthode : Neutralisation in vivo sur veaux immuns.

Dans cette méthode, le matériel suspect n'est plus mélangé à un sérum de bovin préparé contre la peste bovine et à un sérum de bovin réceptif avant d'être inoculé à des bovins réceptifs, mais il est inoculé tel quel à deux lots d'animaux : un lot de bovins rendus immuns par vaccination avec un virus vaccin et un lot de bovins réceptifs.

C'est en quelque sorte, une séro-neutralisation différée, les anticorps neutralisants existant dans le sérum même des animaux immuns mais n'existant pas dans celui des bovins réceptifs.

— *Veaux.* Cinq bovins au moins sont nécessaires. Ils doivent provenir d'une zone indemne de peste bovine et doivent être garantis non vaccinés contre cette maladie. A l'arrivée au laboratoire, ils sont saignés. Si on en a les facilités, on constatera l'absence d'anticorps neutralisants dans leur sérum par séro-neutralisation (voir plus bas : II).

Deux des animaux sont vaccinés avec un virus-vaccin (capripéste ou lapinisé). Normalement ils font une réaction légère mais nette consistant en une montée de température et l'établissement d'une diarrhée pendant un à deux jours. Ces animaux peuvent être considérés comme immuns deux à trois semaines après la vaccination.

— *Matériel suspect.* Mêmes précautions à prendre et même traitement que pour la première méthode ; une dilution (1/10, poids pour volume) est utilisée.

On peut également utiliser le sang citraté ou verséné (voir fiche technique n° 3) comme matériel suspect ; il devra être conservé sous glace, mais ne pas être congelé.

— *Technique de l'épreuve.* Les deux animaux immuns et deux des réceptifs reçoivent par voie sous-cutanée 10 ml de la suspension tissulaire à 10 pour 100. Les bovins sont examinés journellement pendant deux semaines. La température est prise tous les matins. Si le virus pesteux est présent dans l'inoculum, les animaux réceptifs, mais non les immuns, réagissent en 1 à 11 jours. On recherchera comme précédemment les lésions anatomopathologiques sur les animaux morts.

Les non-réagissants et les survivants sont éprouvés 2 à 3 semaines plus tard par inoculation d'un virus bovipésteux virulent ou un virus-vaccin caprinisé, en même temps que le 5^e animal restant. C'est le moyen de faire la part d'un virus bovipésteux à virulence amoindrie qui aurait pu être présent dans le prélèvement.

II. Dans la recherche des anticorps neutralisants

Le diagnostic de peste bovine peut être précisé par la mise en évidence dans le sérum des animaux atteints de la formation d'anticorps spécifiques, anti-peste bovine. Cette mise en évidence nécessite l'examen simultané de deux prélèvements de sérum pour chaque animal. Un sérum est prélevé avant contact ou durant la phase aiguë de la maladie, l'autre est récolté trois semaines après le début des signes cliniques. Etant donné que l'on recherche une montée du taux des anticorps neutralisants, l'examen d'un sérum unique n'apporte aucun renseignement démonstratif, à moins qu'il ne vise à démontrer l'absence d'anticorps ou que l'on opère dans une région primitivement vierge d'infection pestique.

Le principe de la méthode est simple : le sérum avant contact, ou à la période aiguë, et le sérum à la période de convalescence, sont mélangés chacun à des dilutions de virus. Les différents mélanges sont inoculés à des animaux sensibles.

La montée du taux des anticorps neutralisants est confirmée si le titre du virus qui détermine l'apparition des symptômes ou lésions caractéristiques en présence de sérum de convalescent est inférieur (ou neutralise totalement) au titre du virus qui détermine l'apparition des mêmes symptômes ou lésions en présence de sérum prélevé avant contact ou en phase aiguë.

Plusieurs méthodes ont été proposées utilisant des virus pestiques modifiés : séro-neutralisation du virus bovipestique caprinisé sur bœuf ; séro-neutralisation du virus bovipestique lapinisé sur lapin ; séro-neutralisation du virus bovipestique avianisé sur œuf ; séro-neutralisation du virus bovipestique adapté à la culture cellulaire sur cultures de tissus.

Considérons successivement ces différentes méthodes.

1. *Virus caprinisé sur bovin.*

— *Sérums.* La technique d'obtention des sérums est celle décrite précédemment. Un prélèvement de 20 ml de sang est largement suffisant (voir fiche technique n° 7). Le sérum avant contact ou à la phase aiguë et celui de la période de convalescence sont inactivés pendant 30 minutes à 56 °C, puis refroidis avant utilisation.

Dans le cas où la quantité de sérum obtenu serait faible, une dilution au 1/10 en sérum physiologique peut être réalisée.

— *Virus.* Le virus bovipestique caprinisé est dilué au 1/10 (poids de poudre sèche par volume de diluant) dans une solution isotonique glacée, puis les dilutions 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 sont réalisées.

— *Technique.* Un minimum de vingt bovins reconnus sensibles à la peste bovine est nécessaire. 5 ml de sérum prélevé à la phase aiguë sont mélangés à un volume égal de chaque dilution du virus.

De la même façon 5 ml de sérum prélevé à la période de convalescence sont mélangés à un volume égal de chaque dilution de virus. Les tubes sont marqués, puis les mélanges sont agités et laissés une nuit au réfrigérateur. Le lendemain matin, 2 ml de chacun des mélanges sont injectés par voie sous-cutanée à deux bovins, en changeant d'aiguille et de seringue pour chaque mélange.

On prend chaque matin la température des animaux inoculés, en prenant soin de désinfecter les thermomètres aussitôt après chaque prise de température.

L'existence de virus non neutralisé dans les mélanges se traduit dans les huit jours par une montée de la température suivie par l'apparition de légers signes cliniques. La spécificité de la réponse est confirmée en éprouvant les bovins deux semaines plus tard par l'inoculation du virus bovipestique virulent ou par réinoculation avec du virus caprinisé.

Le diagnostic de peste est confirmé si le sérum prélevé à la convalescence a fait baisser d'au moins 100 fois (2 dilutions) le titre du virus par rapport à celui du mélange virus-sérum de la phase aiguë.

2. Virus lapinisé sur lapin.

a) Technique de SCOTT et BROWN

— *Sérums*. Mêmes précautions pour le prélèvement que précédemment. Les sérums sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes, puis dilués au 1/5 en sérum physiologique. Les dilutions sont poussées à 1/50... 1/5.000 pour les sérums prélevés pendant la convalescence.

— *Lapins*. Les différentes races de lapins européens (*Oryctolagus cuniculus*) peuvent être utilisées. Chaque individu devant être âgé d'au moins 4 mois et peser 1,5 à 2 kg.

— *Virus*. On utilise le virus lapinisé Nakamura III. On se sert d'un stock de virus conservé lyophilisé à — 20 °C ; ce peut très bien être le vaccin courant.

Détermination du titre : La séro-neutralisation étant faite en présence de 20-200 DI_{50} lapin, il est nécessaire de connaître le titre du stock de virus. On réalise donc un titrage préalable du stock : on prélève 2 flacons qui sont réhydratés avec de l'eau distillée dans leur volume primitif, puis on réalise en sérum physiologique glacé des dilutions du 1/10 au 1/1.000.000. On inocule par voie intraveineuse cinq lapins par dilution. Cinq jours plus tard, on sacrifie les lapins, et on note les lésions pathognomoniques à l'autopsie. On calcule le titre infectant (DI_{50}) 50 p. 100 par la méthode de REED et MUENCH.

— *Technique*. On dilue le virus-stock de façon à avoir une dilution contenant 20-200 DI_{50} /ml.

A chaque volume de chaque dilution (1/5, 1/50, 1/500, 1/5.000) de sérum de la phase convalescente, on ajoute un volume de suspension virulente. On opère de même avec le sérum de la phase aiguë, sur les dilutions 1/1 et 1/5. Les tubes de mélanges sont étiquetés, et mis à incuber, soit une heure à 37°, soit une nuit au réfrigérateur. Un échantillon de la dilution de virus subit le même traitement.

On inocule, par voie intraveineuse, trois à cinq lapins par mélange, en changeant de seringue et d'aiguille pour chaque mélange. Les lapins sont sacrifiés cinq jours plus tard, autopsiés pour la reconnaissance des lésions pathognomoniques.

L'apparition d'anticorps bovipestiques est indiquée par l'incapacité du sérum de la phase aiguë à neutraliser le virus (présence de lésions pathognomoniques) et l'aptitude des plus faibles dilutions du sérum de la période de convalescence à empêcher l'infection (aucune lésion).

b) Technique de HUARD, ANDRÉ et FOURNIER (1959)

— *Sérums*. Le sérum avant contact ou de la période aiguë, et le sérum de la période de convalescence sont également inactivés 30 minutes à 56 °C. A l'inverse de la technique de SCOTT, les sérums ne sont pas dilués.

— *Virus*. Proviens du broyat des ganglions mésentériques, fraîchement prélevés sur des lapins infectés avec le virus bovipestique lapinisé. Ce broyat est mis en suspension dans une solution de HANKS avec 10 p. 100 de sérum de cheval de manière à obtenir une dilution 1/5 (poids/volume) puis des dilutions décimales en sérum physiologique + sérum de cheval sont réalisées jusqu'au 1/5.000.000.

— *Technique*. Comme pour la technique de SCOTT et BROWN, les différentes races de lapins européens pesant 1,5 kg sont utilisables ; deux ml de sérum de la période aiguë sont mélangés à un volume égal de chaque dilution du virus, et simultanément deux ml de sérum de la période de convalescence sont aussi mélangés à des volumes égaux des dilutions du virus. Les mélanges sont agités puis portés à 37 °C pendant une heure. Un ml de chacun d'eux est injecté par voie intraveineuse à deux lapins. Les températures rectales des animaux sont prises tous les jours. Les lapins sont sacrifiés cinq jours après l'inoculation.

On conclut à la présence d'anticorps antipestiques dans le sérum de la convalescence, si ce sérum a réduit d'au moins 100 fois (2 log.) le titre du virus par rapport à celui mélangé au sérum de la phase aiguë.

3. *Virus bovipestique adapté à la culture cellulaire sur cultures cellulaires.*

— *Sérums.* Le sérum avant contact ou à la période aiguë de la maladie et celui de la période de convalescence sont inactivés à 56 °C pendant trente minutes. Pour un résultat qualitatif, il est inutile de les diluer.

— *Virus.* La souche de virus adaptée à la culture cellulaire est diluée d'après les résultats de titrages précédents de façon à contenir $10^{2,2}$ DC₅₀ par ml. Pour comparer utilement les résultats entre les différents instituts, il est recommandé d'utiliser la souche RPKOBK de l'E. A. V. R. O., Muguga, Kenya.

— *Technique.* Les cultures de cellules sont réalisées à partir de cellules de reins d'embryons de veau. Des volumes égaux de virus et de sérum de la période aiguë sont mélangés. De la même façon, on mélange aussi des volumes égaux de virus et de sérum de la période de convalescence. Les mélanges sont laissés 1 heure à 37 °C puis chacun d'eux est ajouté à une suspension de cellules de rein de veau (une partie de mélange pour 9 parties de suspension cellulaire dans son milieu de croissance), puis on répartit 1 ml de chaque mélange dans des tubes pyrex de 14 mm, bouchés au caoutchouc. Les cellules forment des tapis monocellulaires sur les parois des tubes qui les contiennent. Dès que le tapis est formé, on met les tubes sur un « roller-tube ». Les cultures de cellules sont examinées chaque jour pendant 12 jours après renouvellement du milieu lorsque ce dernier devient trop acide.

La présence d'anticorps bovipestiques est indiquée par l'inaptitude du virus adapté aux cultures cellulaires de provoquer des modifications cytopathiques en présence de sérum de la période de convalescence, alors qu'en présence de sérum de la période aiguë le virus détruit la couche cellulaire.

4. *Virus bovipestique avianisé sur embryon de poulet.*

— *Sérums.* Les deux sérums sont toujours inactivés 30 minutes à 56 °C.

— *Virus.* C'est la variante Muguga de la souche japonaise de virus bovipestique avianisé qui est utilisée car elle tue 90 pour 100 des embryons de poulet inoculés.

— *Technique.* Les œufs sont incubés cinq jours à 39° puis ils sont mirés de façon à éliminer les œufs non fécondés. Des volumes égaux de chaque sérum et de virus sont mélangés et les mélanges sont laissés une nuit au réfrigérateur. Le lendemain 0,5 ml de chaque mélange sont injectés dans le vitellus de vingt-cinq œufs. Cinquante œufs seront donc nécessaires pour étudier une paire de sérum. Les œufs inoculés sont replacés dans l'incubateur à 35 °C. Ils sont suivis tous les jours pendant dix jours et les morts sont notés.

L'existence des anticorps est indiquée par le faible taux de mortalité chez les œufs inoculés avec le virus mélangé au sérum de la période de convalescence alors que le taux de mortalité chez les œufs inoculés avec le virus mélangé au sérum de la période aiguë est élevé.

Une différence de 60 pour 100 dans les deux taux de mortalité est significative.

Remarque : C'est pour être complet que nous mentionnons cette dernière méthode. Si elle a donné de bons résultats en Afrique orientale et en Extrême-Orient, il a été difficile de la mettre en œuvre en Afrique centrale et occidentale.

FICHE TECHNIQUE N° 5

LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT**A. — Mise en évidence de l'antigène****I. Technique de Nakamura**

(voir : Manuel technique et d'application : la réaction de déviation du complément en matière de peste bovine, O. I. E., 1959).

Réactifs

Les réactifs sont mesurés au moyen de pipettes de 1 ml, dans des tubes de Kahn d'un diamètre intérieur de 10 mm et d'une hauteur de 90 mm, que l'on remplit jusqu'à un volume total de 5 ml. La solution utilisée pour diluer les réactifs et les mélanger est une solution à 0,85 p. 100 de NaCl dont le pH est ajusté à 7,2-7,4 au moyen d'un tampon phosphaté M/150.

Suspension d'hématies.

Du sang de chèvre frais, défibriné sur billes de verre, est utilisé pour obtenir une suspension d'hématies. Les hématies sont lavées par centrifugation à plusieurs reprises avec une solution salée à 0,85 p. 100 jusqu'à ce que le surnageant devienne limpide ; le sédiment est alors pipeté dans le volume de solution salée tamponnée nécessaire pour obtenir une suspension à 2,2 p. 100 en volume.

Complément.

Il est préférable d'utiliser le complément lyophilisé ; sa conservation est satisfaisante à basse température. C'est celui dont l'emploi est le plus commode dans les pays tropicaux et le moins sujet à des variations de titre.

Sérum hémolytique.

Du sérum de lapins immunisés par des injections répétées d'hématies lavées de chèvres, est utilisé comme hémolysine. Elle est titrée en présence d'hématies de chèvres à 2,2 p. 100 et en présence de complément au 1/15. Les mélanges sont placés 30 minutes à 38°C. La plus forte dilution de sérum de lapin provoquant une lyse complète représente l'unité hémolytique.

Hématies sensibilisées.

La suspension d'hématies à 2,2 p. 100 est sensibilisée avec quatre unités d'hémolysine ; la quantité réelle d'hémolysine à ajouter doit être calculée de façon qu'elle ne puisse pas excéder 5 p. 100 du volume de la suspension d'hématies.

Sérums.

Le sérum de bovin hyperimmun ou le sérum de lapin convalescent peuvent être utilisés.

- Le sérum de bovin est obtenu par saignée de taureaux très réceptifs, qui ont d'abord reçu une immunité de base contre la peste bovine par vaccination au moyen d'un virus vivant ou tué, puis des injections répétées d'un virus très virulent à intervalle d'une semaine. Ces injections sont des suspensions fraîches à 10 p. 100 de ganglions lymphatiques de bovins infectés. On inocule d'abord 50 ml et en augmentant de 50 ml chaque semaine on arrive à 500 ml. La première saignée est effectuée 14 jours après la dernière inoculation de virus. On le conserve congelé en attendant son titrage et son utilisation. Ce sérum est utilisé sans chauffage préalable. Il est titré en présence d'un antigène standard.

Un antigène négatif est préparé de la même façon à partir des ganglions d'un bovin sain.

— *Titrage du complément.*

On détermine d'abord la dose minimale hémolytique de complément en présence du sérum anti-bovipestique de référence car certains sérums ont un pouvoir anticomplémentaire.

Dans une première série de 6 tubes qui doivent permettre de déterminer la dose minimale hémolytique en l'absence de sérum, le complément est réparti en série par volume de 0,3, 0,25 et 0,2 ml des dilutions à 1/80 et à 1/40 (tableau 2). Dans une seconde série de 9 tubes qui doivent permettre de déterminer la dose minimale hémolytique du complément après contact avec le sérum antibovipestique, 0,1 ml de dilution à 1/10 du sérum et des volumes de complément 0,3, 0,25, 0,2 ml des dilutions à 1/20, 1/40 et 1/80 sont successivement répartis. Les tubes sont alors complétés à 0,4 ml avec du sérum physiologique. Après une période de fixation de 4 heures à 1-5 °C ou de 2 heures à 20-25 °C, 0,1 ml d'une suspension de globules rouges sensibilisés sont ajoutés à chacun des tubes. Ceux-ci sont alors placés au bain-marie à 38° pendant 30 minutes.

TABLEAU 2

Détermination de la dose minimale hémolytique de complément (technique de Nakamura)

Mesure de la dose hémostatique de C'							Mesure de la dose hémostatique de C' avec sérum								
N° du tube à essai							N° du tube à essai								
1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sérum au 1/10.....							0,1.....								
<div>1/401/80</div>							<div>1/201/401/80</div>								
Complément...	0,3	0,25	0,2	0,3	0,25	0,2	0,3	0,25	0,2	0,3	0,25	0,2	0,3	0,25	0,2
Sérum physiologique	0,1	0,15	0,2	0,1	0,15	0,2	0,05	0,1		0,05	0,1		0,05	0,1	
Période de fixation...	4 heures à 1-5 °C ou 2 heures à 20-25 °C														
Suspension d'hématies sensibilisées								0,1							
Temps d'hémolyse...	30 minutes à 38 °C														

La dose de complément à utiliser est calculée sur la base de la valeur de la dose minimale hémolytique du complément en présence de sérum antibovipestique : elle contient, dans un volume de 0,1 ml, 1,2 de cette dose minimale hémolytique.

— Epreuve finale.

Neuf tubes sont nécessaires pour la réaction elle-même et quatre pour les témoins.

Dans les neuf tubes l'antigène, le sérum et le complément sont mélangés ensemble. L'antigène est réparti dans les volumes de 0,2, 0,1 et 0,05 ml en trois séries, correspondant aux dilutions 1/1, 1/8 et 1/64. Le complément est ajouté à la dilution précédemment calculée sous le volume de 0,1 ml et le sérum à la dilution 1/10 sous le volume de 0,1 ml, le volume total de chaque tube étant ramené à 0,4 ml avec de l'eau physiologique.

Les tubes témoins comprennent 3 tubes sans sérum (antigène aux trois dilutions sous volume de 0,2 ml complément et sérum physiologique) et un tube sans antigène mais avec du sérum, complément et eau physiologique. La fixation du complément s'effectue soit à 1-5° C pendant 4 heures, soit à 20-25 °C pendant 2 heures. Le couple hémolytique (0,1 ml de globules rouges sensibilisés) est alors ajouté et la lecture s'effectue après contact pendant 30 minutes au bain-marie à 38 °C.

TABLEAU 3

Epreuve finale

Réactifs	Numéro des tubes à essai												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C1	C2	C3	C4
	1/1			1/8			1/64			1/1	1/8	1/64	
Antigène	0,2	0,1	0,03	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05	0,2	0,2	0,2	
sérum physiologique		0,1	0,15		0,1	0,15		0,1	0,15	0,1	0,1	0,1	
C' (1 à 2 DH)							0,1						
Sérum au 1/10					0,1								
Période de fixation	4 heures à 1-5 °C ou 2 heures à 20-25 °C												
Hématies sensibilisées							0,1						
Temps d'hémolyse	30 minutes à 38°												
Diagnostic	Exemples (les chiffres expriment les degrés d'hémolyse)												
Positif	0	0	0	0	0	1,5	3	4	4	4	4	4	4
Positif	3	2	1	0	0	0	1	3	4	4	4	4	4
Positif	2	1	0	1	2,5	3,5	4	4	4	4	4	4	4
Faiblement positif	2	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Douteux	4	4	3,5	3,5	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Négatif	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Les résultats sont calculés d'après l'intensité de l'hémolyse estimée par rapport à une série de témoins standardisés. La réaction est fortement positive si l'hémolyse est totalement inhibée dans trois tubes au moins ; modérément positive pour un ou deux tubes ; faiblement positive si l'hémolyse est partielle (++) ou (+) dans un ou plusieurs tubes ; douteuse si l'hémolyse est partielle (±) dans un ou plusieurs tubes, et négative si l'hémolyse est complète dans tous les tubes.

La présence de l'antigène peut être décelée par la méthode de fixation du complément à partir du 2^e ou 3^e jour de l'hyperthermie, le maximum du pouvoir antigénique se situant aux 3^e et 4^e jours. Si l'évolution de la maladie est très rapide, la mort de l'animal peut survenir avant l'apparition d'une réaction positive.

2. Technique de Boulanger

— Sérums de référence.

D'après BOULANGER, des lapins sont inoculés avec 3 ml d'une suspension à 1/25 (poids/volume) en eau physiologique, de rate de lapin infecté avec la souche lapinisée Nakamura III de virus bovipestique. Des saignées sont faites antérieurement à l'inoculation pour servir de contrôle. Quinze jours après l'inoculation, les lapins sont saignés et chaque sérum est éprouvé individuellement par la réaction de fixation du complément en utilisant comme antigène des extraits chimiques de rates de lapins infectés de virus lapinisé.

Les sérums qui après dilution au 1/20 ou 1/40 fixent 3 unités hémolytiques 50 p. 100 de complément, sont mélangés et servent de sérum de référence. Ils sont conservés soit congelés soit lyophilisés.

En fait, la souche de virus bovipestique lapinisé Nakamura III tuant en Afrique noire la plupart des lapins inoculés, ceux-ci sont d'abord immunisés par inoculations de sérum hyperimmun (voir fiche technique n° 6, 2^e temps) puis reçoivent le virus lapinisé le jour suivant par voie intraveineuse. Ils reçoivent ensuite tous les quatre jours des inoculations intrapéritonéales de 1 ml, 2 ml et 4 ml de suspension à 30 p. 100 en eau physiologique de ganglions lymphatiques de lapins infectés avec la souche Nakamura III. Le sérum est récolté 9 jours après la dernière injection par ponction cardiaque.

Des sérums de lapins normaux non infectés sont utilisés comme sérums témoins.

Les sérums normaux et les sérums immuns sont inactivés à 56 °C pendant 30 minutes juste avant leur utilisation.

— Antigène.

La rate fraîche du bovin est prélevée et la capsule enlevée soigneusement. On pèse 100 g de pulpe, qui sont broyés dans un mixer ou dans un mortier avec approximativement 500 ml d'acétone refroidi.

Le mélange est agité pendant 20 minutes dans un réfrigérateur à 9 °C ; ensuite il est centrifugé à 2.000 tours/mn, pendant 30 minutes. Le sédiment est remis en suspension dans le même volume d'acétone refroidie que précédemment, et les mêmes opérations sont recommencées. L'extraction à l'acétone est répétée encore une fois puis le sédiment est soumis à l'extraction avec un mélange d'acétone et d'éther anhydre et finalement deux fois avec de l'éther anhydre pur. Toutes les extractions sont faites en chambre réfrigérée.

Du chloroforme à la concentration de 1 p. 100 est ajouté pendant 24 heures à la dernière extraction pour inactiver le virus. Ensuite l'éther résiduel est évaporé sous vide pendant deux heures ou jusqu'à ce que le matériel splénique prenne l'aspect d'une poudre sèche. Cette poudre est mise en suspension dans 100 ml d'eau physiologique et agitée durant une nuit à 9 °C. Elle est alors centrifugée pendant 15 minutes à 2.000 tours/mn. Le sédiment est rejeté. Le liquide surnageant est de nouveau centrifugé à 10.000 tours/mn pendant une heure. Le surnageant final constitue l'antigène suspect.

— Complément.

Etant donné sa plus grande stabilité et sa facilité de conservation, c'est le complément lyophilisé qui est utilisé.

— Système hémolytique.

Le sérum hémolytique provient de lapins adultes ayant reçu des injections (intraveineuses ou intrapéritonéales) répétées de 7 à 10 jours d'intervalle de quantités croissantes de suspensions concentrées d'hématies de mouton lavées.

Ce sérum est titré vis-à-vis d'une suspension d'hématies de mouton à 2,5 p. 100 en présence d'un excès de complément. La plus forte dilution de sérum de lapin provoquant l'hémolyse complète des hématies représente l'unité hémolytique.

Dans la réaction finale, une suspension à 2,5 p. 100 d'hématies de mouton en solution physiologique tamponnée, est sensibilisée en ajoutant 5 unités hémolytiques de sérum hémolytique.

— Technique.

La méthode utilisée pour titrer le complément est celle décrite dans « *The standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health* ».

La dose hémolytique 50 p. 100 (DH 50) de complément est calculée en présence de la dilution à 1/5 de sérum immun ou de sérum de lapin normal. La période de fixation est de une heure à 37 °C, suivie de 30 minutes à 37 °C après addition des globules rouges de mouton sensibilisés.

Deux séries de dilutions d'antigène sont préparées sous le volume de 0,1 ml. Les dilutions sont en progression géométrique de raison 2.

Le complément, dilué de façon à présenter trois doses hémolytiques 50 p. 100 sous un volume de 0,1 ml, est ajouté à chaque tube ; 0,1 ml de sérum immun de lapin inactivé par la chaleur dilué au 1/5 est ajouté aux tubes de la 1^{re} série, tandis que 0,1 ml de sérum de lapin réceptif dilué au 1/5 est ajouté aux tubes de la 2^e série. La fixation se fait 18 heures à \pm 9 °C. Après ce temps, 0,2 ml d'une suspension à 2,5 p. 100 d'hématies de moutons sont ajoutés à chaque tube. La lecture se fait après incubation de 30 minutes à 37 °C.

L'antigène bovine spécifique est mis en évidence dans le prélèvement suspect par la constatation d'hématies intactes dans les tubes de la 1^{re} série contenant la plus faible dilution d'antigène.

3. Technique de Cowan

— Antigène.

Les ganglions lymphatiques des viscères et de la carcasse des animaux suspects de peste bovine sont prélevés. La graisse et la capsule sont éliminées et les ganglions sont coupés en fins morceaux aux ciseaux avant d'être broyés dans un mortier avec du sable et un pilon. On obtient une pâte homogène qui, centrifugée pendant 10 minutes à 2.000 tours/mn, laisse exsuder un liquide que l'on recueille. Ce liquide est dilué au 1/4 dans du tampon véronal (voir plus loin) et centrifugé pendant 1 heure à 2.000 tours/mn. Trois couches distinctes apparaissent après centrifugation : une couche supérieure blanche graisseuse, une couche moyenne assez trouble et un sédiment dans le fond. La couche moyenne est recueillie par siphonage à la pipette. Elle constitue l'antigène.

— Anticorps.

Dans la technique originale, le sérum hyperimmun antipestique est préparé en inoculant à des lapins par voie intraveineuse (veine marginale de l'oreille) la souche lapinisée-avianisée du virus bovine et en continuant par des inoculations répétées de ganglions de lapins infectés.

On peut avec avantage se servir de la méthode décrite dans la fiche technique n° 6, 2^e temps, qui ne réclame pas d'inoculation préalable de virus lapinisé-avianisé.

Le sérum est inactivé 30 minutes à 56 °C avant son usage.

— Complément.

Il est constitué par du sérum de cobayes adultes en bonne santé, saignés à blanc par ponction cardiaque. Le sérum est prélevé autour du caillot et centrifugé au froid. Le surnageant qui constitue le complément est conservé à — 40 °C dans des tubes de 2 ml bouchés. Étant donné les difficultés d'avoir un bon complément de cette façon là dans les conditions climatiques de l'Afrique centrale, le complément qui est utilisé le plus généralement est du complément lyophilisé venant d'Europe.

— Système hémolytique.

Le sérum hémolytique est obtenu chez des lapins adultes qui ont reçu des injections intraveineuses trois fois par semaine de doses croissantes d'une suspension concentrée de stroma de globules rouges de moutons soigneusement lavés et bouillis. Douze doses sont administrées et cinq jours après la dernière injection les lapins sont saignés à blanc par ponction cardiaque. Les sérums sont récoltés et chauffés à 56 °C pendant 30 minutes avant d'être stockés à — 40 °C. La quantité optimale d'anticorps pour sensibiliser les hématies de mouton est ensuite déterminée.

Une suspension à 5 p. 100 d'hématies de mouton lavées et préparées en tampon véronal est ajustée pour contenir 10^9 cellules par ml. Un volume égal d'une dilution appropriée de sérum de lapin anti-globules rouges de mouton est alors ajouté.

— Technique.

La dose hémolytique 50 p. 100 du complément est déterminée en présence du sérum de lapin hyperimmun. La dose de sérum de lapin hyperimmun à utiliser est déterminée par la plus haute concentration qui n'a pas de pouvoir anticomplémentaire mais qui donne cependant une bonne fixation avec un antigène positif connu. (Le sérum hyperimmun utilisé par Cowan est dilué au 1/50).

L'antigène qui avait été dilué au 1/4 au cours de sa préparation, est encore dilué au 1/5 de façon à obtenir une dilution finale au 1/20.

Des dilutions 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 et 1/1280 sont alors réalisées en tampon véronal *.

Trois séries de tubes contenant chacune 0,2 ml des différentes dilutions de l'antigène sont préparées. La première série est celle de la réaction, la deuxième et la troisième servent de témoins. 0,2 ml de sérum de lapin hyperimmun sont ajoutés aux tubes de la 2^e série et 0,35 ml de tampon véronal aux tubes de la 3^e série.

0,25 ml de complément dilué de façon à contenir sous ce volume 5 doses hémolytiques 50 p. 100 sont ajoutés à chaque tube de la 1^{re} et de la 2^e séries. Les tubes de la 3^e série ne reçoivent que 0,1 ml de la même dilution de complément, ce qui, en fait, représente deux doses hémolytiques 50 p. 100.

Les tubes sont laissés une nuit au réfrigérateur, puis ils sont réchauffés à 37 °C pendant 15 minutes avant de recevoir chacun 0,1 ml d'hématies de mouton sensibilisées. Ils sont alors mis au bain-marie à 37 °C, pendant une heure, puis finalement placés au réfrigérateur. La lecture est faite une heure ou deux plus tard, après que les globules rouges non lysés se soient déposés.

TABLEAU 4
Déviation du complément, technique de Cowan

	1 ^{re} série					2 ^e série					3 ^e série				
	1/40				1/1280	1/40				1/1280	1/40				1/1280
Antigène	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sérum	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2										
Tampon véronal						0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Complément	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Période de fixation	18 heures à 4 °C, puis 15 minutes à 37 °C														
Hématies sensibilisées	0,1														
Période d'hémolyse	1 heure à 37 °C, puis 2 heures à 4 °C														

L'antigène bovipestique spécifique dans le prélèvement suspect est révélé par la présence d'hématies non hémolysées dans les tubes de la 1^{re} série, contenant les plus faibles dilutions d'antigène.

* Le tampon véronal ou solution de Mayer-Kraft est préférable à l'eau physiologique pour les solutions dans les réactions de fixation du complément parce qu'il apporte les quantités optimales de Ca^{++} et Mg^{++} pour l'activité du complément, au pH le plus favorable.

Pour constituer la solution mère qui est conservée à 4 °C, il convient de faire dissoudre 5,75 g de véronal dans 500 ml d'eau distillée en chauffant légèrement puis de compléter à 2.000 ml en ajoutant 3,75 g de véronal sodique, 15 g de chlorure de sodium, 1,68 g de chlorure de magnésium et 0,28 g de chlorure de calcium.

Cette solution est autoclavée 20 minutes à 105 °C avant d'être conservée à 4 °C. Son pH doit être de 7,2.

Lors de son emploi, elle est diluée au 1/5 en eau distillée.

4. Technique de Stone et Moulton

— Anticorps.

Des lapins (blancs de Nouvelle-Zélande) sont infectés par inoculation intraveineuse de 1 ml de suspension du virus bovipestique lapinisé Nakamura III, représentant approximativement cent doses infectantes. Trois autres inoculations sont réalisées dans la semaine et des prélèvements de sang sont effectués sur les lapins le huitième, le douzième et le quatorzième jour après la dernière inoculation. Les sérums sont mélangés et stockés à -40°C . Avant usage, le sérum est chauffé à 56°C pendant 30 minutes.

Des sérums de contrôle sont collectés à partir de lapins normaux.

— Antigène.

Les ganglions lymphatiques mésentériques sont prélevés sur un bovin sacrifié, dans l'expérience de STONE et MOULTON, quatre jours après le début de la maladie. Les ganglions sont débarrassés de leur graisse, découpés en petits morceaux avec des ciseaux et homogénéisés dans un mixer pendant 10 minutes avec un poids égal de tampon phosphaté. Ce tampon phosphaté contient 5,52 g de phosphate monosodique, 9,56 g de phosphate disodique par litre et possède un pH de 6,8. Le mélange obtenu après mixage est centrifugé pendant 30 minutes à 3.000 tours/mn à une température de $0 - 5^{\circ}\text{C}$.

Après la centrifugation, trois couches distinctes sont visibles dans le tube : un bouchon graisseux sur le dessus, une couche liquide brune opaque dans le milieu et un sédiment au fond.

La couche médiane est récupérée avec soin en évitant les souillures avec la couche graisseuse ; elle est centrifugée alors à 10.000 tours/mn pendant 30 minutes. Il apparaît encore, moins nettement cependant, trois couches différentes. La couche médiane est récoltée et représente l'antigène dilué au 1/2. Des ganglions lymphatiques mésentériques d'animaux normaux sont traités de la même façon et servent d'antigène de contrôle.

— Complément.

STONE et MOULTON utilisent du sérum frais de cobaye stocké à -40°C , mais comme pour la technique de COWAN, le complément lyophilisé est préférable dans les conditions climatiques de l'Afrique centrale.

— Tubes utilisés dans la réaction de déviation du C'.

Des tubes de 7,5 par 10 mm contenant des globules rouges hémolysés sont calibrés à une longueur d'onde de 541 angströms dans un spectrophotomètre Beckman DU. Tous les tubes, dont la densité optique varie de plus de 5 p. 100, sont rejetés.

— Système hémolytique.

Du sang de mouton est recueilli aseptiquement dans un volume égal de solution d'Alsever stérile et entreposée à 2°C .

La solution d'Alsever est composée de 20,5 g de glucose, 8 g de citrate de soude, 4,2 g de chlorure de sodium, dissous dans 1.000 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,1 avec une solution d'acide citrique à 5 p. 100.

La stérilisation est réalisée en chauffant cette solution trois jours de suite pendant 30 minutes à 100°C .

La suspension de globules rouges en Alsever est centrifugée à 1.000 tours/mn pendant 10 minutes et lavée trois fois dans 10 fois son volume de tampon véronal. Une suspension à 5 p. 100 est constituée en ajoutant 1 ml de culot de centrifugation à 19 ml de tampon véronal*.

Un millilitre de cette suspension est alors lysé dans 14 ml d'une solution à 0,1 p. 100 de carbonate disodique. La densité optique de la solution rouge clair ainsi obtenue est déterminée au spectro-

* Le tampon véronal utilisé ici contient 0,1 pour cent de gélatine.

photomètre Beckman DU à une longueur d'onde de 541 angströms dans des cuves de 10 mm avec une solution de carbonate disodique à 0,1 p. 100 comme référence. Dans ces conditions, une densité optique de 0,68 correspond à la présence de 10^9 cellules par millilitre de la suspension originale à 5 p. 100 de globules rouges.

Quand la densité optique est trop forte, du tampon véronal est ajouté à la suspension d'hématies à 5 p. 100.

Pour connaître la quantité de tampon véronal à ajouter, il convient d'appliquer la formule suivante :

Si OD_1 est la densité optique de la suspension d'hématies à 5 p. 100 lue au spectrophotomètre, V_1 le volume restant de la suspension initiale de globules rouges après avoir enlevé les 1 ml, soit 19 ml, et V_2 le volume final à réaliser pour avoir 10^9 cellules par ml de cette suspension :

$$\frac{OD_1}{0,680} \times V_1 = V_2$$

Une fois la suspension de globules rouges ajustée, on y ajoute un égal volume d'une dilution appropriée de sérum hémolytique de lapin selon la méthode d'OSLER.

Ce sérum hémolytique est préparé en administrant à des lapins douze inoculations intraveineuses, trois par semaine, de stroma d'hématies de mouton lavées et bouillies 20 minutes ; les quantités inoculées vont en croissant, avec 0,5 ml au début, et 4 ml à la fin. Cinq jours après la dernière injection, les lapins sont saignés par ponction cardiaque. Les sérums sont chauffés individuellement 30 minutes à 56° et conservés à — 40 °C.

— Techniques.

STONE et MOULTON envisagent deux techniques différentes.

1° Fixation du complément avec des dilutions de l'antigène :

Le sérum de lapin hyperimmun et les différentes dilutions de l'antigène entrent dans la réaction sous un volume de 0,4 ml. Le sérum de lapin hyperimmun est dilué au 1/40 ; l'antigène au 1/40, 1/60, 1/80, 1/100, 1/120, tandis que le complément est dilué de façon à avoir cinq unités hémolytiques 50 p. 100 sous un volume de 0,5 ml. Le pouvoir anticomplémentaire de chaque antigène essayé est déterminé pour la plus faible dilution de l'antigène, soit le 1/40, en présence de 1, 2, 3, 4 et 5 unités hémolytiques 50 p. 100 de complément.

La fixation peut se faire aussi bien une heure à 38 °C qu'une nuit à 5 °C. La lecture est faite après addition de 0,2 ml de globules rouges sensibilisés (10^8 cellules) à chaque tube et incubation pendant 30 minutes à 37 °C.

Tous les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 1.000 tours/mn, et le degré d'hémolyse est estimé visuellement par comparaison avec des tubes contenant 25, 50 et 75 p. 100 d'hématies complètement hémolysées.

Les tubes hémolysés à 50 p. 100 sont désignés par le chiffre 2 ; la lecture s'arrête à ces tubes.

2° Fixation du complément avec des dilutions de complément.

Dans cette technique, l'antigène et le sérum hyperimmun sont utilisés à concentration constante tandis que le complément intervient à des dilutions variables.

Une solution stock de complément est utilisée ; elle est constituée habituellement par du complément dilué au 1/30. Puis des sous-dilutions contenant 0,6. 9, 13, 20, 45 et 67 p. 100 de cette solution-stock sont réalisées.

La réaction de fixation du complément se fait ici en quatre séries de tubes.

Chaque série comprend neuf tubes qui correspondent chacun à une sous-dilution de la solution stock de complément.

Dans la première série, les tubes contiennent 1 ml de chaque sous-dilution de complément, 0,4 ml d'antigène et 0,4 ml de sérum ; c'est la série réaction.

Les trois autres séries sont les séries témoins.

Dans la deuxième série, les 0,4 ml de sérum sont remplacés par 0,4 ml de tampon véronal, les autres constituants étant inchangés.

Dans la troisième série, ce sont les 0,4 ml d'antigène qui sont remplacés par 0,4 ml de tampon véronal, le complément et le sérum restant inchangés.

Enfin dans la quatrième série, seul le complément reste, le sérum et l'antigène sont remplacés dans chaque tube par 0,8 ml de tampon véronal.

Dans chaque série, le 1^{er} tube qui ne contient pas de complément (0 p. 100 de la solution-stock) sert à contrôler le pouvoir hémolytique de chaque facteur de la réaction.

TABLEAU 5

Technique n° 1 de Stone et Moulton

Sous-dilutions du stock de complément (p. 100)	Disposition de la réaction								
	0	6	9	13	20	30	45	67	100
1 ^{re} série (série réaction)

2 ^e réaction (témoin antigène)

3 ^e réaction (témoin sérum)

4 ^e série (témoin complément)

Pour les 4 séries: 1 h au bain-marie à 37 °C puis 0,4 ml hématies sensibilisées dans tous les tubes. 30 minutes au bain-marie à 37 °C.									

Après incubation au bain-marie à 37 °C pendant une heure, 0,4 ml d'hématies de mouton sensibilisées sont ajoutés à chaque tube. L'incubation est reprise pendant 30 minutes à 37 °C, puis les tubes sont centrifugés à 1.000 tours/mn pendant 10 minutes. Le degré d'hémolyse est déterminé dans un spectrophotomètre Beckman DU à une longueur d'onde de 541 angströms. Le pourcentage d'hémolyse est calculé, converti en probits et porté en ordonnée sur un graphique. Les logarithmes correspondants aux sous-dilutions de la solution stock de complément sont portés en abscisse; la courbe expérimentale est tracée et le logarithme de C' qui donnerait l'hémolyse 50 p. 100 est déterminé: par le point où la courbe expérimentale coupe l'horizontale menée par le probit 5, on trace une perpendiculaire qui coupe l'axe des abscisses au point cherché.

STONE et MOULTON ont montré que dans cette technique le sérum hyperimmun dilué au 1/40 fixe le complément au maximum et perd le pouvoir anticomplémentaire qu'il pouvait avoir aux basses dilutions. De même, la dilution d'antigène au 1/40 est suffisante pour éviter l'effet de prozone des

basses dilutions, et apporter en outre suffisamment de matériel pour avoir une fixation maximale de complément.

Le logarithme de la dilution du complément qui donne 50 p. 100 d'hémolyse est déterminé en présence de l'antigène seul et en présence du complexe antigène-sérum. Ces logarithmes sont ensuite convertis en antilogarithmes qui représentent les volumes de complément nécessaires pour obtenir 50 p. 100 d'hémolyse. La différence entre ces volumes montre la quantité de complément fixée par le système antigène-sérum.

Cette quantité est nulle s'il n'y a pas correspondance entre l'antigène et le sérum mis en présence, c'est-à-dire, si d'une part, le sérum ne contient pas d'anticorps (cas du sérum de contrôle collecté à partir de lapins normaux), d'autre part, si l'antigène ne correspond pas aux anticorps contenus dans le sérum.

L'antigène bovipestique spécifique dans le prélèvement suspect est révélé par une certaine fixation du complément avec le sérum hyperimmun, fixation qui sera nulle si le prélèvement suspect ne contient pas cet antigène.

B. Mise en évidence des anticorps.

Les difficultés, pour mettre en évidence les anticorps viraux dans les sérums de bovins par fixation du complément sont à l'heure actuelle trop importantes, et les résultats trop inconstants, pour que l'on puisse songer à utiliser cette technique comme méthode diagnostic.

Un test indirect semblable à celui utilisé pour la mise en évidence des anticorps dans le sérum de bovins convalescents de fièvre aphteuse apporterait une solution, mais il reste à être précisé.

FICHE TECHNIQUE N° 6

LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION EN GÉLOSE *

1^{er} TEMPS

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES DE RÉFÉRENCE

Matériel.

1. — Matériel à stériliser à l'autoclave (ou à défaut par ébullition dans l'eau)

- 1 seringue de 20 cc
- Aiguilles 4-8/10
- 100 ml d'eau distillée
- 2 litres de sérum physiologique
- Bol de 1 litre en verre de mixeur Turmix
- 8 bocaux de verre (genre bocaux à confiture)
- 1 éprouvette de 1 l
- Bouchons de caoutchouc pour flacons 2 cc.

2. — Matériel à stériliser au four

- Couteau à autopsie
- Boîte à instruments comprenant : 1 bistouri,
 - 1 pince à dents de souris 17 cm,
 - 1 pince en cœur,
 - 1 paire de ciseaux.
- 1 plateau émaillé
- 1 entonnoir de 1 l, monté avec une double couche de gaze
- 1 ballon de 500 cc ou 1 l
- 1.000 flacons de 2 cc ou 1.000 ampoules 2 cc fond plat
- 5 boîtes de Petri, diamètre 10 cm
- 10 tubes, diamètre 16 mm
- 6 pipettes graduées de 5 cc
- Canne de verre pour pipettes Pasteur.

3. — Produits chimiques

- Alcool à 95° (ou 90°)
- Chlorure de sodium

4. — Matériel divers

- Ciseaux courbes de 17 cm
- Numéros d'identification (ou peinture à l'huile et pinceau)

* La réaction de précipitation en milieu gélifié utilisant la méthode des disques n'est pas décrite ici. On se reportera à la publication originale de A. Provost et coll. : Recherches sur une méthode rapide de diagnostic de la peste bovine, publiée dans cette Revue (16, n° 3 ; 287-95).

- Thermomètre médical au 1/10°
- Rhéomètres de 2 et 5 cc.
- Crayon à verre
- Réfrigérateur — si possible, freezer à — 20 °C
- Agar cutters (ou tubes de verre, de paroi de 5/10 mm d'épaisseur, et de diamètre intérieur de 5 mm ; par exemple : col d'ampoule à vaccin).

5. — Produits biologiques

- Gélase pour précipitation
- Sérum de lapin, antipestique de référence
- Virus capripéste (CAPRISEC).

6. — Animaux

- 8 chevreaux (ou 8 veaux).

Protocole.

Dans les territoires où n'existe pas la peste bovine, la sécurité impose de n'y pas manipuler de virus virulent. Par ailleurs, dans ceux qui à l'heure actuelle sont l'objet (ou vont l'être dans un avenir très rapproché) de campagnes d'éradication de peste, on aura vraisemblablement d'assez grandes difficultés à se procurer des veaux réceptifs. Pour ces raisons, il semble préférable de préparer les antigènes de référence à partir de chèvres et de virus capripéste. On pourrait également, si l'on était sûr de la réceptivité des veaux, inoculer des veaux avec le virus capripéste. La technique décrite est valable pour le lapin et le virus lapinisé ; il n'y a qu'une transposition de mots à faire. Un tel antigène n'est toutefois pas recommandé à cause des précipitations non spécifiques qui peuvent se produire entre ces antigènes et les immuns sérums de lapin.

Jour 0. — Choisir 8 chevreaux âgés de 8 mois à 1 an, en bonne santé apparente, ne toussant et ne mouchant pas (pleuro-pneumonie contagieuse). On a avantage à choisir les animaux des races sahélierines (poil long, oreilles tombantes) plutôt que ceux de race dite guinéenne (poil ras, oreilles dressées) dont la réceptivité au virus capripéste est douteuse.

Loger les animaux très à l'aise : enclos spacieux, eau et fourrage à discrétion, quelques branches d'acacia ou d'un arbre épineux. Si le temps est frais (tornade ou saison fraîche) ne pas hésiter à mettre un brasero dans l'enclos. Les numérotiser (numéros à l'oreille, numéros à la peinture). Prendre les températures le matin de très bonne heure, dès le lever du soleil. *Désinfecter les thermomètres à l'alcool entre chaque prise de température.* Reporter les températures sur un graphique. N'inoculer que les chèvres dont la température est inférieure à 39 °C. Éliminer impitoyablement les autres, suspects d'être atteints de pleuro-pneumonie.

— A l'aide d'une seringue de 20 cc remplie d'eau distillée stérile et munie d'une aiguille 4-8/10, perforer le bouchon d'un flacon de vaccin antipestique caprinisé *. Le liquide doit être attiré dans le flacon par le vide relatif qui y règne. S'il n'en est pas ainsi, rejeter le flacon et en prendre un autre.

La dissolution du produit lyophilisé est immédiate ; inoculer 1 ml à 5 chèvres par voie sous-cutanée. Il reste donc 3 chèvres non inoculées,

— détruire le reste du virus et désinfecter le matériel par ébullition.

Jours 1 à 5. — Prendre la température tous les matins juste après le lever du soleil. Désinfecter les thermomètres. Reporter les températures sur un graphique.

La réaction thermique s'amorce les jours 3 ou 4 : elle est nette 24 heures plus tard : minimum thermique de 40 °C et écart d'au moins 1,5 °C entre la température du jour 0 et celle des jours 4 ou 5. Ne conserver que les chèvres inoculées qui satisfont à ce critère. Les 3 chèvres non inoculées doivent avoir une température éte. S'il n'en est pas ainsi, ne pas les utiliser par la suite.

* CAPRISEC du Laboratoire de Farcha ; CAPRIBOVIPESTE du Laboratoire de Dakar.

Jour 6.

1. — *Abattre les chèvres par égorgement et saignée, en commençant par les chèvres non inoculées.*

Lever la peau. A l'aide des outils stériles appropriés (pincès à dents de souris, bistouri, ciseaux) prélever le plus proprement possible les ganglions lymphatiques superficiels : préaxillaires, précru-raux, inguinaux, poplités. Les mettre dans un récipient stérile (boîte de Pétri ou jarre de verre).

Luxer les articulations coxofémorales pour maintenir le cadavre sur le dos. Lever les épaules, prélever les ganglions sous-axillaires.

Inciser la ligne blanche. Eviscérer ; conserver les viscères. Prélever les ganglions inguinaux profonds, rénaux et lombo-aortiques. Sur les viscères, prélever les ganglions mésentériques (sur la chèvre, c'est une longue masse d'une dizaine de cm, adjacente à la courbure interne de l'iléum).

Ouvrir la cage thoracique et constater le bon état du poumon. Toute pneumonie en évolution entraîne le rejet de la récolte ; il doit en être de même des infarctissements pseudo-hémorragiques des lobes apicaux (pneumonie néo-rickettsienne).

Dès que l'on en a terminé avec un animal, mettre la récolte sous froid. Ne pas mélanger les récoltes venant des chèvres infectées et non infectées.

2. — *Préparation de l'antigène.* La préparation de l'antigène négatif (chèvres non inoculées) et positif (chèvres inoculées) est la même. On débutera par l'antigène négatif.

Dans un plateau émaillé, débarrasser les ganglions du conjonctif, de la graisse qui les entourent. Décapsuler soigneusement. Mélanger les récoltes (3 prélèvements négatifs ou 5 prélèvements positifs).

Peser, noter le poids.

Introduire les ganglions dans le bol de verre d'un mixeur Turmix.

Ajouter les 2/3 en volume de sérum physiologique (c'est-à-dire ganglions : 1 partie en poids ; sérum physiologique : 2 parties en volume) mesuré à l'aide d'une éprouvette. Fermer le bol du Turmix et maintenir fermement le couvercle à la main. Passer directement sur la vitesse 3. Emulsionner 3 minutes en arrêtant de temps à autre pour ne pas faire chauffer trop le moteur.

Passer le broyat homogénéisé sur un entonnoir de 2 l équipé d'une double couche de gaze. Ne recueillir dans un récipient entouré de glace que ce qui passe au travers de la gaze.

A l'aide d'un rhéomètre calibré, répartir à raison de 2 ml dans de petits flacons ou de petites ampoules stériles, maintenues sur de la glace fondante. Conserver 10 ml de l'antigène positif pour titrage immédiat. Fermer les flacons au bouchon de caoutchouc ou sceller les ampoules. Etiqueter au sparadrap en écrivant au crayon à bille : antigène capripésteque positif (ou négatif) de référence ; dater.

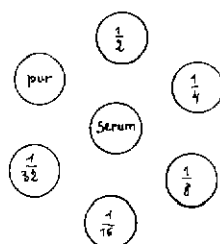
Congeler immédiatement à — 20 °C ou à défaut, dans le freezer d'un réfrigérateur.

3. — *Titration de l'antigène positif.* Ce titrage doit être mené en même temps que se fait la réparti-tion.

a) Préparer 4 boîtes de Pétri avec gélose à précipitation et cupules ainsi qu'il est dit plus loin. Avec le crayon à verre, noter les dilutions d'antigènes selon le schéma ci-joint.

b) Disposer sur un portoir 5 tubes de 16. Porter dans chacun d'eux 5 ml de sérum physiologique, à l'aide d'une pipette. Marquer dans l'ordre les tubes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

c) A l'aide d'une pipette de 5 cc, prélever 5 ml de l'antigène et le porter dans le tube marqué 1/2. Bien mélanger en aspirant et refoulant plusieurs fois.



Prendre une nouvelle pipette. Prélever 5 ml du mélange 1/2 et le porter dans le tube marqué 1/4. Opérer comme précédemment... Ainsi de suite jusqu'au tube 1/32.

(Si l'on possède un rhéomètre, on peut faire les dilutions à l'aide de celui-ci).

d) A l'aide de pipettes Pasteur, remplir les cupules destinées aux différentes dilutions dans les 4 boîtes de gélose, selon le schéma ci-dessus. Changer de pipettes pour chaque dilution.

Répartir le sérum de référence dans les 4 cupules centrales.

Refermer les boîtes.

e) Si la température moyenne de la pièce est supérieure à 35 °C, porter les boîtes de Pétri dans la partie basse d'un réfrigérateur. Si la température oscille entre 20 et 30 °C, laisser les boîtes sur la paillasse du laboratoire.

Jour 7 et 8. — Lire les précipitations au bout de 24 et de 48 heures.

L'antigène est acceptable lorsque les bandes des précipitations existent dans les 4 boîtes, en face des cupules : 1/2, 1/4, 1/8 et dans 2 boîtes au moins en face des cupules : 1/16 (il est possible qu'il existe une bande de précipitation en face des cupules : 1/32). On dit alors que le titre précipitant 50 p. 100 de l'antigène est 1/16.

4. *Epreuve de l'antigène négatif.* — Procéder comme il vient d'être décrit sous la rubrique jour 6-3 pour l'antigène positif, mais n'opérer que sur une seule boîte de Pétri. Il ne doit y avoir aucune précipitation.

Remarque 1. — Lyophilisation de l'antigène. Si l'on possède un appareil à lyophiliser, on peut avec avantage lyophiliser l'antigène de référence. On prendra soin de le répartir dans des flacons ou des ampoules de capacité sensiblement double de celle du volume (2 ml) à lyophiliser. Boucher ou sceller sous vide. Lors de la reconstitution, reprendre dans le volume primitif avant lyophilisation.

Remarque 2. — La technique de l'antigène desséché de SCOTT et BROWN pourrait être employée avec fruit; elle a l'avantage de donner un produit très stable. Mais, réclamant pour sa réalisation du pentoxyde de phosphore, elle semble difficile à mettre en œuvre en Afrique occidentale et centrale.

2^e TEMPS

PRÉPARATION D'UN SÉRUM ANTIBOVIPESTIQUE PRÉCIPITANT DE RÉFÉRENCE

I. — PRÉPARATION DU MATÉRIEL VIRULENT

Matériel.

1. — *Matériel à stériliser à l'autoclave (ou à défaut, par ébullition dans l'eau).*

- 1 seringue 20 cc
- 1 seringue 1 ou 2 cc
- Aiguilles 3-8/10
- Aiguilles 4-6/10
- Boîte de Pétri
- Mortier avec pilon, ou brôyeur de verre genre Tissue grinder
- Pots à centrifuger
- Flacons 10 ou 20 cc avec leurs bouchons de caoutchouc
- 1 l de sérum physiologique.

2. — *Matériel à stériliser au four* (Four Pasteur, ou à défaut four de cuisinière)

- Cannes de verre de 25 cm, bouchées au coton aux 2 extrémités (pour pipettes Pasteur)
- Boîte à instruments comprenant au minimum :
 - 2 pinces à dents de souris, longueur 14 cm
 - 1 bistouri convexe
 - 1 ciseau courbe longueur 12 cm
- Quelques tubes à essai contenant du sable.

3. — *Produits chimiques.*

- Alcool à 95° (ou 90°)
- Alcool iodé ou tout autre antiseptique de contact
- chlorure de sodium
- Péricilline - streptomycine.

4. — *Matériel accessoire.*

- Boîte à contention (facultative)
- Coton hydrophile
- Thermomètre médical au 1/10
- Cages à lapin avec mangeoires
- Graphiques de température
- Plateau à autopsie et cordelette ou planche de bois, clous et marteau
- Rasoir et savon
- Balance ordinaire
- Centrifugeuse de laboratoire (facultative)
- Sparadrap ; crayon à bille
- Réfrigérateur avec freezer accessible et bacs à glace.

5. — *Animaux.*

- 1 lapin.

Protocole.

Jour 0. — Choisir un lapin neuf de 2 kg environ, âgé d'au minimum 4 mois, en bon état de santé. Prendre la température.

— Diluer 1 flacon de virus bovine pestique lapinisé* dans 20 ml de sérum physiologique. A cet effet, introduire le diluant à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille et contenant la quantité requise ; perforer le bouchon à l'aide de l'aiguille ; le liquide doit être absorbé par le vide relatif existant dans le flacon. S'il n'en est pas ainsi, rejeter le flacon et en prendre un autre.

— La dissolution demande quelques secondes. Le produit obtenu par dissolution doit être homogène.

— Placer le lapin dans une boîte à contention. Arracher les poils sur une veine auriculaire externe et désinfecter.

— A l'aide d'une seringue de petit calibre (1 ou 2 cc) et d'une aiguille 4-6/10, injecter, par voie intraveineuse, 1 ml de la suspension reconstituée de virus lapinisé.

* LAPISEC du laboratoire de Recherches vétérinaires de Farcha ; CU NIBOVIPESTE, du Laboratoire de Recherches vétérinaires de Dakar.

- Conserver le reste du virus dilué au freezer (réserve en cas de faute opératoire).
- Mettre le lapin en observation.
- Désinfecter le matériel usagé par ébullition.

Jour J + 1, J + 2. — Prendre la température du lapin le matin de très bonne heure et désinfecter le thermomètre à l'alcool avant et après usage.

Jour J + 3. — Prendre la température comme précédemment. Etablir la courbe de température. Une réaction thermique extrêmement nette doit se manifester : montée de plus 2°C, avec minimum à 40 °C, le maximum pouvant atteindre 41,5 °C.

Préparer une solution physiologique additionnée d'antibiotiques, du type suivant (respecter les proportions si l'on en désire moins) :

— Spécilline G	1.000.000 unités
— Didromycine	1 gramme
— Sérum physiologique	1 litre

La placer au réfrigérateur.

- Peser une boîte de Pétri, noter le poids, la placer dans le freezer d'un réfrigérateur.
- Réfrigérer de la même façon : mortier et pilon, ou broyeur de Pyrex, pots à centrifuger, flacons de 20 cc.

4. — Placer le lapin dans la boîte à contention.

5. — Inoculer *très rapidement* par voie intraveineuse 20 ml d'air (aiguille 4-6/10). Le lapin meurt d'embolie gazeuse dans les secondes suivantes.

6. — Le placer sur le dos dans un plateau à autopsie, et l'attacher les membres en croix. Plus sommairement, on peut le clouer les membres en croix sur une planche.

7. — Raser sommairement l'abdomen. Badigeonner d'une solution antiseptique (anabac, alcool iodé).

8. — Ouvrir l'abdomen en 2 temps : peau, puis plan musculaire que l'on récline sur le côté. Rejeter les outils (bistouri et pince) dont on vient de se servir. Puis, dans l'ordre :

9. — Prélever la rate, avec le minimum de graisse ; pour cela, débrider au long de l'organe suivant la petite courbure. Placer dans la boîte de Pétri tarée, préalablement réfrigérée, que l'on conserve sur de la glace.

— Récliner la masse intestinale sur la droite. Saisir avec la pince l'extrémité libre de l'appendice et débrider l'insertion appendice-iléon en prenant bien garde de *ne pas couper* ce dernier. Cette opération étant faite, on tombe sur la masse ganglionnaire mésentérique dans le prolongement de l'appendice.

La prélever avec le minimum de graisse et la placer avec la rate dans la boîte de Pétri.

— L'appendice étant saisi à l'aide de la pince par son extrémité libre, on chasse son contenu à l'aide des ciseaux, et on la sectionne à l'endroit où se termine la masse lymphatique. Le placer dans la boîte de Pétri.

— Le lapin peut être consommé sans danger.

10. — Peser la boîte pleine, après avoir essuyé l'eau de fonte de la glace présente sur le fond. En déduire par différence le poids des organes récoltés. Les conserver sous froid (freezer d'un réfrigérateur) en attendant la suite des opérations.

11. — Découper rate, ganglions, et appendice en menus fragments. Les broyer avec du sable dans le mortier ou dans un broyeur de Pyrex genre Ten-Broek (*Tissue grinder*).

— Ajouter un volume en ml de sérum physiologique (additionné d'antibiotiques) glacé égal à 2 fois le poids en g d'organes calculé précédemment. Bien homogénéiser.

12. — Si l'on dispose d'une centrifugeuse, centrifuger très légèrement pour sédimenter les gros débris. Si l'on n'en possède pas, laisser une dizaine de minutes au réfrigérateur et aspirer le surnageant avec une pipette Pasteur.

13. — Dans les flacons de 10 ou 20 cc, répartir :

— Dans 6 flacons : 1 ml de suspension virulente

— Dans 3 flacons : 2 ml de suspension virulente

— Dans 3 flacons : 4 ml de suspension virulente.

Boucher au bouchon de caoutchouc. Etiqueter en se servant de sparadrap et d'un stylo à bille.

14. — Placer immédiatement à la température la plus basse possible dont on dispose.

Nota : Le protocole a été détaillé pour 1 lapin inoculé, qui fournit la matériel suffisant à l'hyperimmunisation de 3 autres lapins qui pourront fournir 60 ml de sérum précipitant.

Il y a intérêt à ne pas conserver plus de 6 mois ce sérum précipitant ; c'est dire qu'un laboratoire courant préférera faire une nouvelle production de sérum avec 3 nouveaux lapins plutôt qu'en préparer un gros stock d'emblée.

II. — HYPERIMMUNISATION DES LAPINS

Matériel.

1. — *Matériel à stériliser à l'autoclave (ou à défaut par ébullition dans l'eau).*

— 1 seringue 1 cc

— 1 seringue 5 cc

— 1 seringue 20 cc

— 1 aiguille 4-6/10

— 3 aiguilles 4-8/10

— 3 aiguilles 5-10/10

— 1 litre de sérum physiologique

2. — *Matériel à stériliser au four Pasteur (ou à défaut dans un four de cuisinière).*

— 4 ballons de 50 ou 100 cc à large ouverture, bouchés d'un tampon de gaze

— Canne de verre pour pipettes Pasteur

— 12 tubes à hémolyse

— 16 pipettes de 1 cc

— 3 boîtes de Petri, diamètre 10 cm

— Tubes de verre à fond rond, verre mince, diamètre 5 mm.

3. — *Produits chimiques.*

— Alcool à 95°

— Chlorure de sodium ou sérum physiologique.

4. — *Matériel accessoire.*

— Balance Roberval

— Numéros pour petits animaux

- Coton hydrophile
- Crayon à verre (ou sparadrap et crayon à bille)
- Réfrigérateur
- Centrifugeuse avec pots et godets
- Agar cutters (voir liste de matériel) ou tube de verre de diamètre intérieur 5 mm, à paroi de 5/10 mm d'épaisseur : col d'ampoule à vaccin par exemple.

5. — *Animaux.*

- 3 lapins.

6. — *Matériel biologique.*

- Immunsérum antipestique *
- Antigènes pestiques de référence (positifs et négatifs)
- Gélose à précipitation.

Protocole.

Jour 0. — Choisir 3 lapins de 1,5 à 2 kg en bonne santé. Les peser et numéroter à l'oreille.

A l'aide d'une seringue montée d'une aiguille 4-6/10, inoculer à chaque lapin par voie intraveineuse 2 ml par kg de poids vif, de sérum de lapin antipestique hyperimmun.

Jour 1. — Inoculer à chaque lapin par voie intraveineuse 1 ml de virus lapinisé récolté et conservé comme indiqué précédemment.

Jour 8. — Inoculer à chaque lapin par voie intrapéritonéale 1 ml de virus.

Jour 12. — Inoculer à chaque lapin par voie intrapéritonéale 2 ml de virus.

Jour 16. — Inoculer à chaque lapin par voie intrapéritonéale 4 ml de virus.

Jour 23. — Récolte des sérums.

1° Un aide tient le lapin par les oreilles, membres antérieurs accolés ; on suspend un poids de 1 kg aux membres postérieurs. Arroser d'alcool à 95° la poitrine du lapin et arracher les poils de la région péristernale gauche.

Enfoncer d'un coup sec une aiguille stérile 5-10/10 dans l'avant-dernier espace intercostal gauche, très près du sternum et très verticalement. Arrêter la pénétration de l'aiguille dès que le plan musculocutané est franchi. On voit alors habituellement l'aiguille « danser » sur la pointe du cœur. Enfoncer d'environ 1 cm. Le sang jaillit avec force. En recueillir 5 ml environ dans un ballon stérile à large ouverture. Dès que l'on a la quantité requise, retirer l'aiguille. Boucher stérilement le ballon. Remettre le lapin dans sa cage.

Faire de même pour chacun des 3 autres lapins, les sangs étant recueillis dans des récipients séparés.

2° Laisser coaguler le sang à température ordinaire pendant 30 minutes environ, puis laisser exsuder au réfrigérateur pendant 2 heures. Recueillir le sérum surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'un embout de caoutchouc permettant l'aspiration. Si le sérum est chargé en hématies, centrifuger et recueillir le sérum clair surnageant (environ 2 ml).

3° Eprouver les qualités précipitantes du sérum par dilution du sérum et précipitation en gélose en présence d'antigènes pestiques (positifs et négatifs) de référence.

* Ce sérum doit être un sérum de lapin et non de bœuf afin que les lapins inoculés n'élaborent pas d'anticorps anti-bœuf. De petites quantités de ce sérum peuvent être demandées aux laboratoires de recherches vétérinaires de Farcha el de Dakar.

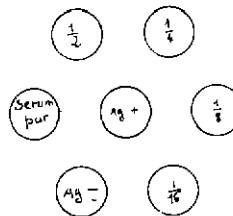
— Dilution du sérum : disposer 4 tubes à hémolyse, marqués au crayon gras 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, sur un portoir et délivrer exactement dans chacun d'eux 1 ml de sérum physiologique à l'aide d'une pipette de 1 cc ou d'un rhéomètre réglé sur cette capacité. A l'aide d'une autre pipette de 1 cc, prélever exactement 1 ml du sérum et le porter dans le tube marqué 1/2. Aspirer et refouler 6 fois afin de bien mélanger, en évitant toutefois de faire des bulles. On a ainsi la dilution 1/2 du sérum.

A l'aide d'une nouvelle pipette de 1 cc, prélever 1 ml dans ce tube et le porter dans le tube marqué 1/4... Ainsi de suite jusqu'à la dilution 1/16.

— Préparer une boîte de Petri remplie de gélose à précipitation (technique décrite dans le Temps n° 3) et y creuser les cupules ad-hoc.

— Délivrer à l'aide de pipettes Pasteur chacune des dilutions de sérum dans les cupules, ainsi qu'il est schématisé ci-dessous. Remplir les cupules à ras bord sans faire déborder ; changer de pipette pour chaque dilution.

Délivrer ensuite (en changeant de pipette pour chacun d'eux) les antigènes pestiques positifs et négatifs.

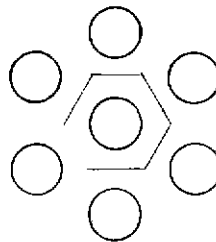


Refermer la boîte de Petri.

Faire de même pour chacun des 3 sérums.

Si la température moyenne de la pièce est supérieure à 35 °C (cas fréquent en Afrique centrale pendant la saison sèche) porter la boîte de Petri dans la partie basse d'un réfrigérateur. Si la température moyenne oscille entre 20 et 30 °C, laisser la boîte sur la pailleasse du laboratoire.

Jour 24. — Lire la précipitation au bout de 18 et 24 heures. On doit avoir la figure ci-dessous pour qu'un sérum soit acceptable. En particulier, il ne doit y avoir aucune précipitation en face du réservoir contenant l'antigène négatif.



S'il en est ainsi, prélever 30 ml de sang à chacun des lapins. On a intérêt à aspirer le sang avec une seringue de 20 cc lorsque l'aiguille a été poussée dans la cavité cardiaque.

Laisser coaguler à température ordinaire. Décoller et fragmenter les caillots à l'aide d'une baguette métallique. Porter au moins 24 heures au réfrigérateur. Aspirer avec précaution le sérum surnageant et le centrifuger s'il contient des hématies. Mélanger ensuite les sérums.

Répartir par quantités de 1 ml dans de petits tubes que l'on scellera à la flamme (à défaut, répartir dans des tronçons étirés de pipettes Pasteur. Congeler à — 20 °C jusqu'à l'emploi désiré. Eviter les décongélations.

Remarque — Si le laboratoire possède un appareil à lyophiliser, on a intérêt à lyophiliser les sérums précipitants. Pour la reconstitution, on prendra soin de les reconstituer dans le volume primitif avec de l'eau distillée.

3^e TEMPS

PRÉPARATION DE LA GÉLOSE ET DES BOÎTES

Matériel.

- 1 récipient de 2 l environ
- 1 Erlenmeyer ou fiole de Fourneau de 500 cc
- 16 tubes Pyrex de 22 mm de diamètre ou 16 flacons à bouchon métallique à vis d'environ 30 cc
- 16 capuchons caoutchouc n° 8
- 1 pince en bois
- 1 pipette ou éprouvette de 25 cc
- 1 agitateur
- 1 source de chaleur

Produits chimiques.

- Difco Noble agar
- Merthiolate

Technique.

1^o Stériliser au four 16 tubes de 22 mm, bouchés au coton et portant un repère extérieur au crayon à verre indiquant la capacité de 25 cc (Au lieu de tubes de 22, on peut également utiliser des flacons de 30 ml à bouchon métallique vissé).

2^o Préparer un bain-marie d'un litre d'eau bouillante.

3^o Peser :

- 5 g de gélose spéciale Difco « Special Agar Noble »
- 0,16 g de Merthiolate.

4^o Mesurer 400 ml d'eau distillée ou déionisée et les porter dans un Erlenmeyer ou une fiole de Fourneau de 500 cc.

Mettre au bain-marie bouillant.

5^o Quand l'eau est chaude, verser la gélose en pluie fine en agitant avec un agitateur de verre pour éviter la formation de grumeaux. Ajouter le merthiolate. Continuer d'agiter jusqu'à dissolution complète (1 heure).

6^o Répartir la gélose chaude dans les tubes ou les flacons jusqu'au trait repère. Fermer les tubes au coton, les flacons avec le bouchon vissé.

7^o Capuchonner les tubes avec des capuchons de caoutchouc. Placer dans un panier. Etiqueter et dater.

8^o Conserver au frigidaire ou à défaut à température ordinaire.

Remarque. Si l'on possède un pH-mètre avec correcteur de température, on a avantage à ame-

ner le pH de la gélose à 8,6 avec une solution de soude 1 M. Ce n'est toutefois pas une obligation pour avoir une gélose correcte mais le contraste des lignes de précipitation est augmenté.

Pour l'emploi de la gélose, se reporter au temps 5.

4^e TEMPS

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES « SUSPECTS » POUR LE DIAGNOSTIC

Matériel.

1. — *Matériel stérilisé à l'autoclave ou par ébullition.*

- Seringues de 5 ou 10 cc
- Aiguilles 3-12/10.

2. — *Matériel stérilisé au four (four Pasteur ou de cuisinière).*

- Couteau à autopsie
- Ciseaux pointus — Pince à dents de souris, pince en cœur
- Mortier, pilon ; ou tissue grinder
- Sable
- Boîtes de Petri
- Tubes à hémolyse ; tubes à centrifuger.

3. — *Matériel courant.*

- Bac à glace
- Bac à déchets
- Portoir
- Centrifugeuse (à main ou électrique)
- Ciseaux courbes
- Corde
- Coton.

4. — *Produits chimiques.*

- Alcool à 95°
- Crésyl ou antiseptique puissant.

Technique.

La technique est différente selon qu'il s'agit d'un cadavre (animal abattu ou mort naturellement) ou d'un animal vivant.

A. — *Cadavre.*

Si l'on peut choisir l'animal avant de l'abattre, le prendre en pleine phase d'évolution, et non au stade terminal de la peste.

Si l'on a affaire à plusieurs cadavres d'animaux morts naturellement, choisir celui qui est le moins décomposé.

— Faire l'autopsie selon la technique classique.

— Prélever le ganglion mésentérique si le cadavre est frais, le ganglion poplité ou pré-scapulaire si le cadavre est partiellement putréfié. Les mettre dans un récipient étanche.

— Détruire le cadavre par incinération, enfouissement ou tout autre méthode. Désinfecter le couteau dans une solution antiseptique. Se désinfecter les mains et les faire désinfecter aux aides éventuels.

— Conserver la boîte de Petri contenant les ganglions dans la glace si l'on n'a pas l'intention de les traiter tout de suite (24-36 heures maximum).

— Décapsuler les ganglions, retirer soigneusement toute la graisse.

— Dans un mortier, découper le ganglion en tous petits fragments, que l'on émince le plus possible. Si cela est nécessaire (présence d'un conjonctif trop abondant), écraser avec un pilon et du sable ou broyer dans un « tissu grinder ». Ne pas ajouter d'eau. On obtient ainsi une sorte de pâte.

— Laisser reposer quelques instants. Si l'exsudation est suffisante, prélever un peu de liquide surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur et le recueillir dans un tube à hémolyse.

— S'il n'y a aucune exsudation de liquide, ajouter un minimum d'eau (2 ml pour un ganglion), mélanger puis centrifuger légèrement (20 minutes à 2.000 tours). Le surnageant constitue l'antigène suspect. Il doit être conservé au froid et employé dans les minutes qui suivent.

Remarque. Si l'on ne dispose pas de centrifugeuse et qu'aucun liquide n'exsude lors du broyage, on se contentera de mettre un peu de purée ganglionnaire dans les cupules creusées dans la gélose (voir temps 5).

B. — Animal vivant (ponction-biopsie).

Immobiliser solidement l'animal ; au besoin, le coucher.

— Repérer à la main l'emplacement des 2 ganglions pré-scapulaires. Couper les poils. Désinfecter à l'alcool.

— D'une main immobiliser le ganglion, de l'autre introduire dans la substance ganglionnaire par perforation de la peau, une aiguille 3-12/10 montée sur une seringue de 5 ou 10 cc.

— Manœuvrer lentement le piston ; on recueille ainsi un peu de suc ganglionnaire. Laisser l'aiguille en place. Rejeter le liquide dans un tube à hémolyse maintenu dans la glace. Recommencer l'opération.

— On peut piquer en 2 ou 3 endroits dans le même ganglion. Répéter l'opération sur le ganglion opposé.

— Le liquide récolté constitue l'antigène suspect.

Remarque. Un même bovin peut être ponctionné sans dommage plusieurs jours de suite.

5^e TEMPS

EXÉCUTION DU TEST DE PRÉCIPITATION-DIFFUSION EN GÉLOSE

L'exécution correcte du test de précipitation-diffusion suppose que les temps préliminaires :

— préparation de la gélose

— préparation et titrage de l'antigène de référence

— préparation et titrage du sérum précipitant

ont été exécutés et que les résultats s'en sont montrés satisfaisants.

Matériel.

1. — Verrerie.

- Boîtes de Petri
- Canne de verre diamètre 5 mm
- Pipettes Pasteur.

2. — *Matériel de laboratoire.*

- Récipient 1 l
- Pince de bois
- Crayon à verre
- Aiguille à dissection
- Scie à verre
- Mireur à fond noir
- Feinberg agar cutters (Réf. 1802) ; voir fiche technique n° 8.

3. — *Matériel divers.*

- Carton glacé blanc
- Lampe de poche.

4. — *Produits chimiques.*

- Crésyl ou antipestique puissant.

5. — *Produits biologiques.*

- Gélose à précipitation (en tube)
- Sérum de référence
- Antigène positif de référence
- Antigène pour diagnostic.

Technique.

1^{er} temps. Préparation des boîtes de gélose.

— Faire fondre au bain-marie bouillant 1 tube de 22 contenant la gélose à précipitation (1 tube suffit pour 2 diagnostics).

— Lorsque la gélose est fondue, la couler dans une boîte de Petri de 10 cm de diamètre. Faire éclater les bulles qui ont pu se former en promenant la flamme d'un bec de gaz sur la gélose ou toucher les bulles avec une baguette très chaude.

— Attendre une heure environ pour que la gélose soit bien solidifiée. On peut à ce moment remettre le couvercle de la boîte de Petri si on le désire.

— On découpe alors des cupules dans la gélose.

Il existe deux techniques :

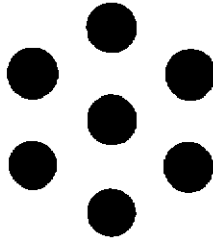
a) On dispose de « Feinberg agar cutters ».

Poser l'appareil sur la gélose et enfoncer fermement et d'une manière égale. Le retirer verticalement. Avec une aiguille à dissection, retirer les petits cylindres ainsi découpés dans la gélose. Il est inutile d'obturer le fond des cupules ainsi forées à l'aide d'une goutte de gélose fondue.

b) On ne dispose pas de « Cutters ».

Préparer à l'avance sur une feuille de papier ou mieux de carton glacé blanc le dessin des cupules :

chaque cupule a 5 mm de diamètre et est séparée de 5 mm des cupules adjacentes ; elle a une capacité d'environ 0,10 cc.



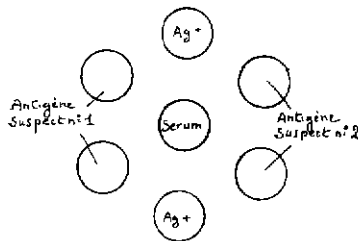
Poser la boîte de Petri, couvercle enlevé, sur le dessin. Prendre un fragment de canne de verre, de diamètre intérieur 5 mm, en verre de 0,5 mm d'épaisseur ; en couper une extrémité à la scie pour avoir des bords tranchants et non pas mousses. Découper les cupules une à une. Retirer les cylindres de gélose avec une aiguille à dissection.

Remarque. Dans les régions sahéliennes (Tchad, Niger, Mali) il y a avantage à couler la gélose dans les boîtes juste avant l'emploi pour éviter leur dessiccation rapide, surtout en saison sèche. Dans les autres régions, moins chaudes et plus humides, on peut préparer les boîtes à l'avance et les garder dans une boîte de fer blanc bien fermée. Elles devront être utilisées dans un délai de un à trois mois selon l'hygroscopie.

2^e temps. Remplissage des cupules.

1^o Faire décongeler une ampoule de sérum précipitant et une ampoule (ou flacon) d'antigène de référence.

2^o A l'aide de pipettes Pasteur (1 pour chaque réactif) disposer le ou les antigènes suspects dans les cupules ainsi qu'il est indiqué sur le schéma ; remplir 2 cupules pour chaque antigène (cela n'est parfois pas possible pour les antigènes obtenus par biopsie).



Faire attention de ne faire déborder aucun réactif en dehors des cupules.

Si cela se produisait, absorber immédiatement la partie en excès avec une lame de papier buvard ou un peu de coton hydrophile, que l'on jette ensuite dans une solution antiseptique.

3^o Remplir les cupules destinées à l'antigène de référence.

Immerger immédiatement après usage les pipettes ayant servi à la répartition de ces différents antigènes dans une solution antiseptique (eau crésylée à 2 p. 100, par exemple).

4^o Remplir la cupule destinée au sérum précipitant.

5^o Fermer la boîte.

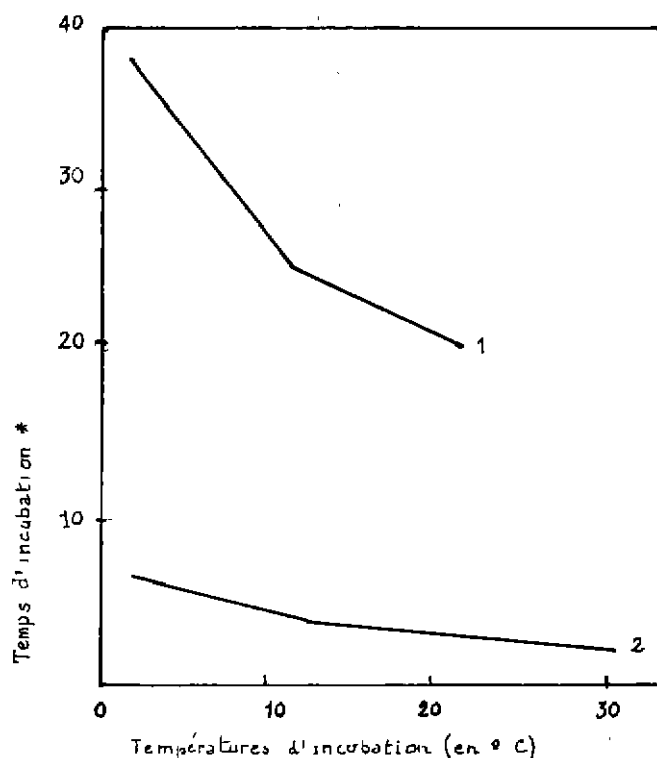
6^o Numéroté la boîte et faire au crayon à verre un repère sur la face inférieure. Dessiner sommairement la disposition des cupules sur une feuille de papier ; y porter le repère et le numéro de la boîte. Noter les références des antigènes suspects et toutes indications utiles. Conserver ce papier.

3^e temps. — Incubation des boîtes.

La vitesse d'apparition de la (ou quelquefois des) ligne (s) de précipitation est fonction de la dis-

tance séparant les cupules et fonction inverse de la température, ainsi que le montre la figure ci-dessous (fig. 4).

Figure 4



1- écart des cupules = 10 mm

2- écart des cupules = 4 mm

* = nombre d'heures nécessaire pour constater le premier signe de précipitation (d'après G.R. Scott)

Cependant, il n'y a plus de précipitation à une température supérieure à 30 °C dans n'importe quel système de cupule ; avec le système où les cupules sont distantes de 10 mm (*cas des cupules faites avec les Feinberg cutters*), la précipitation ne se manifeste pas si la température est supérieure à 20 °C.

En effet, le précipitogène est relativement thermolabile. Le tableau suivant en rend compte.

TABLEAU 1 (d'après G. R. Scott)

Température (en °C)	Validité
— 20 °C	1 an
10	de 96 à 117 heures
20	de 24 à 48 heures
30	de 6 à 18 heures
40	de 11 à 12 minutes
50	de 3 à 6 minutes

Validité d'un précipitogène ayant un titre 50 p. 100 initial.

En opérant à une température supérieure à 30 °C, on s'expose à trouver négatif un prélèvement de très faible titre antigénique (ponction-biopsie en début ou en fin de maladie, ou autopsie d'un cadavre au stade terminal de la peste).

La figure 5 et le tableau 2 permettront de comprendre le bien fondé de ce raisonnement.

Figure 5

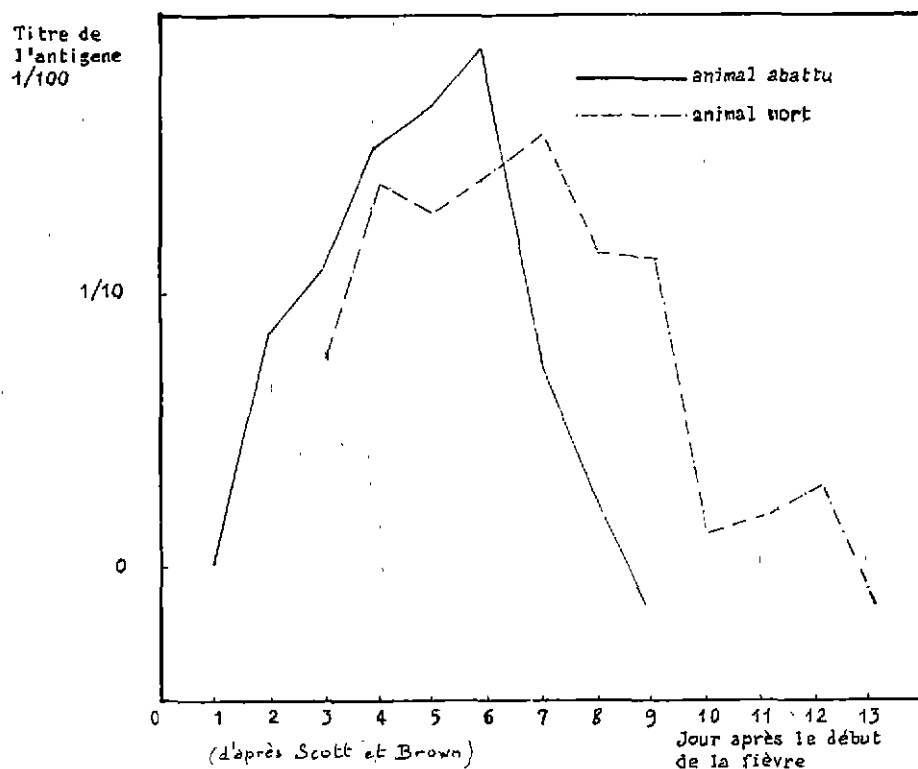


TABLEAU 2 (d'après G. R. Scott)

Température en °C.	Largeur de la zone de diffusion	
	4 mm	10 mm
1-4	$6,9 \pm 0,7$	$38,4 \pm 1,5$
9-14	$4,4 \pm 0,4$	$24,8 \pm 2,0$
20-24	$3,2 \pm 0,2$	$20,9 \pm 20,4$
29-30	$2,3 \pm 0,2$?
38-40		

Nombre d'heures requises pour l'apparition du premier signe de précipitation.

Les conditions d'incubation seront donc définies selon la température extérieure.

— Si la température moyenne est supérieure à 25 °C, placer les boîtes de gélose dans la partie basse d'un réfrigérateur ;

— Si la température moyenne est inférieure à 20 °C, on peut laisser les boîtes sur la paille du laboratoire. La vitesse de précipitation sera ainsi augmentée.

En pratique toutefois, et lorsque le diagnostic ne présente pas une urgence telle qu'il doive être posé à 1 heure près, il est prudent de toujours placer les boîtes de gélose dans le réfrigérateur. Si l'on opère en brousse (et ceci est tout spécialement vrai pour les régions sahéliennes), on devra placer les boîtes de gélose dans une boîte à glace.

4^e temps. Lecture.

— On fera 3 lectures au bout de 12, 24 et 48 heures, temps conditionné par la température d'incubation (tableau 2).

— Se placer dans une pièce sombre. Tenir la boîte horizontale au-dessus d'un fond noir (carton noir), et l'éclairer obliquement par en dessous avec le pinceau lumineux d'une lampe de poche.

Si l'on a de nombreux examens à faire, réaliser une boîte à éclairage inférieur conforme au modèle ci-dessous.

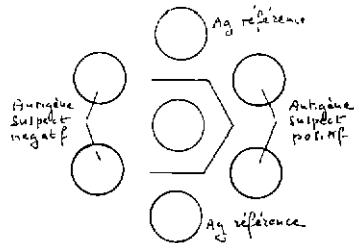
— La réaction positive est caractérisée par une bande blanche de précipité à l'intérieur de la gélose.

Elle doit s'être développée entre les cupules contenant l'antigène de référence et le sérum hyperimmun.

Si l'un des antigènes suspects contient le précipitogène bovine, une bande similaire se développera entre les cupules qui le contiennent et le sérum. De plus, elle se fondra sans discontinuité dans la bande précédente.

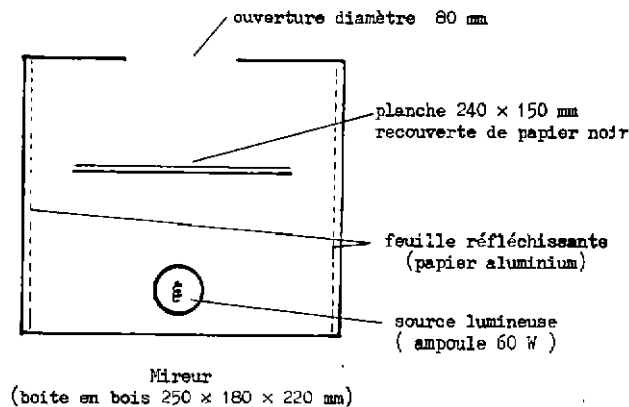
Les bandes de précipitation qui peuvent se produire mais ne se fondent pas avec la bande témoin ou la croisent ne sont pas dues au virus bovine mais à d'autres systèmes antigènes-anticorps.

Remarque. Il est possible que deux bandes de précipitation parallèles existent. Cette seconde bande est due à un précipitogène extrêmement thermolabile qui n'est habituellement pas détecté. La figure ci-dessous donne l'interprétation d'une réaction.



— Noter les résultats par écrit.

— Lorsque toutes les lectures sont terminées, stériliser les boîtes par autoclavage ou par immersion dans l'eau crésylée à 2 p. 100 pendant 24 heures.



FICHE TECHNIQUE N° 7

**MÉTHODOLOGIE DES PRÉLÈVEMENTS DE SÉRUM
POUR DIAGNOSTIC RÉTROSPECTIF DE PESTE BOVINE**

(ou pour apprécier la montée des anticorps après vaccination)

Matériel.

- Marques à l'oreille numérotées et pince, ou peinture à l'huile et pinceau, ou ciseaux courbes
- tubes à essais bouchés au coton, stériles
- flacons 20 cc, avec bouchon caoutchouc, stériles ou stérilisés par ébullition prolongée
- fil de fer rigide
- lampe à alcool ou autre source de chaleur
- sparadrap, crayon à bille. Alcool à 90°, coton
- ciseaux
- aiguilles de fort calibre, stérilisées ou longuement bouillies.

1. Marquer les animaux sur lesquels on désire faire un séro-diagnostic avec une marque à l'oreille numérotée, ou un numéro tracé à la peinture ou aux ciseaux. Numéroté les tubes à essais.

2. Couper les poils sur la gouttière jugulaire. Désinfecter à l'alcool.

3. Prendre une aiguille stérile à ponction intraveineuse, en faisant en sorte de ne pas toucher l'embout. Ponctionner la veine. Faire couler le sang dans un tube à essai, que l'on rebouche aussitôt après. Mettre à température ambiante, en position verticale pendant quelques heures.

4. A l'aide d'un fil de fer rigide, préalablement flambé pour assurer sa stérilité, décoller le caillot de la paroi du tube. Laisser encore exsuder 4 heures à température ordinaire, puis 20 heures au réfrigérateur ou dans la boîte à glace.

5. Rejeter le sérum dans un flacon de 20 cc. Boucher. Entourer bouchon et goulot de sparadrap. Numéroté. Congeler si possible.

6. Conserver et expédier sous froid avec une fiche de renseignements.

7. Une vingtaine de jours plus tard, opérer de la même façon sur les mêmes animaux. Inscrire « 2^e prélèvement » sur les flacons, en dessous du numéro.

8. Un délai d'un mois après le second envoi est nécessaire au laboratoire avant de donner les résultats.

FICHE TECHNIQUE N° 8

ADRESSES UTILES

Réactifs.

Gélose spéciale Noble (Special Noble Agar) ...	Difco, c/o O. S. I. 141, rue de Javel, Paris (15 ^e).
Appareil à eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> • Büchi, Flawil, Saint-Gall, Suisse, en France représenté par Sofranie, 40, rue d'Artois, Paris (8^e). • Jouan, 113, Bd St.-Germain, Paris (6^e).
Appareil à eau déionisée	Paris-Labo, 7, rue du Cardinal-Lemoine, Paris (5 ^e).
Chlorure de sodium	Prolabo, 12, rue Pelée, Paris (11 ^e).
Merthiolate (= thimerosal)	Serlabo, 26, rue St-Gilles, Paris (3 ^e).
Versénate de sodium	Serlabo, 26, rue St-Gilles, Paris (3 ^e).

Appareils.

Autoclave	Lequeux, 64, rue Gay-Lussac, Paris (5 ^e).
Balance	O. S. I. 141, rue de Javel, Paris (15 ^e).
Centrifugeuse électrique et tubes à centrifuger à main	<ul style="list-style-type: none"> Jouan, 113, Bd St-Germain, Paris (6^e). Prolabo, 12, rue Pelée, Paris (11^e).
Aiguilles à dissection	Boubée et Cie, Place St-André des Arts, Paris (6 ^e).
Feinberg agar cutters (n° 1802)	Shandon Scientific Co. Ltd, 6, Cromwell Place, London SW 7.
Verrerie	Verrerie Générale, 39, rue des Cloys, Paris (19 ^e).
Instruments de chirurgie	Méca-Vigor, 88, rue de la Folie Méricourt, Paris (11 ^e).
Tissue grinders	Kontes glass Co, Vineland, Nj, U. S. A.

BIBLIOGRAPHIE RESTREINTE

- BOULANGER (P.). — The use of complement fixation test for the demonstration of rinderpest virus in rabbit tissue using rabbit antisera. *Canad. J. comp. Med.* 1957, 21 (11) : 363-9.
- COWAN (K. M.). — Cité par SCOTT (G. R.) et BROWN (R. D.) (1961).
- CURASSON (G.). — Traité de Pathologie exotique vétérinaire et comparée, 2^e édition, Tome 1. — Vigot frères, éditeurs. Paris, 1942.
- DAUBNEY (Y. R.). — In « Les vaccins contre la peste bovine ». Monographie agricole F. A. O., n° 13. Rome, 1949.
- HUARD (M.), ANDRÉ (J.) et FOURNIER (J.). — Essais de titrage des anticorps neutralisant le virus bovipestique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, 96 : 506.
- JOHNSON (R. H.). — Rinderpest in sheep in Nigeria. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1957, 5 (4) : 504.
- LOWE (H. J.), WILDE (J. K. H.), LEE (R. P.) et STUCHBERY (M. N.). — *J. comp. Path.*, 1957, 57 : 175.
- MONTGOMERY (R. E.). — Cité par BROWN (R. D.) et SCOTT (G. R.). Mucosal disease complex. *Vet. Rec.* 1957, 69 : 916.
- MORNET (P.) et GILBERT (Y.). — Bases et moyens du diagnostic de la peste bovine. *Bull. O. I. E.*, 1960, 53 : 13.
- MORNET (P.) ORUE (J.) et GILBERT (Y.). — Unicité et plasticité du virus bovipestique. *C. R. Acad. Sci.*, 1956, 242 (24) : 2886.
- NAKAMURA (J.). — Manuel technique d'application : la réaction de déviation du complément en matière de peste bovine. Monographie de l'O. I. E. Paris, 1959.
- OTTE (E.). — A note on a rinderpest-like disease in the Sudan and in Aethiopia. *Bull. epiz. Dis. Afr.* 1961, 9 (3) : 215.
- PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — Studies with rinderpest virus in tissue culture. A technique for the detection and titration of virulent virus in cattle tissue. *Res. vet. Sci.* 1962, 3 (1) : 94-103.
- PLOWRIGHT (W.). — Some properties of strain of rinderpest virus recently isolated in East Africa. *Res. vet. Sci.* 1963, 4 (1) : 96.
- RECEVEUR (P.). — Note sur certaines affections du cheptel des régions nord-est du Tchad. La peste bovine expérimentale. *Rec. Méd. vét. exo.* 1938, 11 (4) : 159-66.
- RECEVEUR (P.). — Réflexions sur l'épidémiologie de la peste bovine, en Afrique centrale, *Bull. O.I.E.* 1951 (janv.-févr.).
- RECEVEUR (P.). — Les animaux sauvages dans la transmission des maladies contagieuses sauf la rage, 22^e session du Comité de l'O. I. E. 1954, 42 : 213.
- ROBSON (J.), ARNOLD (R. M.), PLOWRIGHT (W.) et SCOTT (G. R.). — The isolation from an eland of a strain of rinderpest virus attenuated for cattle. *Bull. epiz. Dis. Afr.* 1959, 7, (1) : 97.
- SCOTT (G. R.). — Optimal incubation temperature for the rinderpest agar gel double diffusion test. *Bull. Epiz. Dis. Afr.* 1962, 10 : 457.
- SCOTT (G. R.). — Bovine hyperimmun serum in the diagnostic of rinderpest. *Vet. Rec.* 1962, 68 (3) : 308-14.

- SCOTT (G. R.) et BROWN (R. D.). — Rinderpest diagnosis with special reference to the agar gel double diffusion test. *Bull. epiz. Dis. Afr.* 1961, 9 (2) : 83.
- SCOTT (G. R.) et McDONALD (J.). — Kenya camels and rinderpest. *Bull. epiz. Dis. Afr.* 1962, 10 (4) : 495.
- STONE (S. S.) et MOULTON (W. M.). — A rapid serologic test for rinderpest virus. *Am. J. vet. Res.* 1961 (86) : 18-22.
- THIÉRY (G.). — Influence du type de virus et de l'espèce affectée sur les lésions de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1956, 9 (2) : 109-16.
- WHITE (G.) et SCOTT (G. R.). — An indirect gel diffusion precipitation test for the detection of rinderpest antibody in convalescent cattle. *Res. vet. Sci.* 1960, 1 (3) : 226-9.